Université Docteur YAHYA FARES MEDEA

Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie

Département Des Sciences Biologique

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine: Science De La Nature Et De La Vie

Filière: Biologie

Spécialité: Biotechnologie Et Microbiologie Appliqué

Thème

Screening de l'activité antifongique de quelques souches lactiques autochtones de la viande salée séchée traditionnelle

Soutenu Publiquement

Le: 18/09/2017

Présenté Par: Boukhatem Wiam et Boukhelkhal Hanane

Devant le jury :

Président :	**M^{r}. BENNADJI Amine**	**MAA**	**Université de Médéa**
Encadreur :	**M^{r}. BOUBAKRI Kamel**	**MAB**	**Université de Médéa**
Examinateurs :	**M^{r}. RAHAL Mohamed**	**MAB**	**Université de Médéa**
	M^{me}. BOUHERAMA Amina	**MAB**	**Université de Médéa**

Année universitaire: 2016/2017

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier «Allah» Le Généreux qui a enseigné à l'homme ce qu'Il ne savait pas et qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

Nous tenons, particulièrement, à remercier nos parents pour leur soutien permanent et le réconfort qu'ils nous ont prodigué tout au long de notre cursus universitaire, pour les efforts et les sacrifices faits pour que nous puissions réaliser nos rêves.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire pédagogique du département de Biologie, de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, de l'Université YAHYA FARES de Médéa.

Nous tenons, aussi, à adresser infiniment toute notre grande gratitude à nos encadreur **BOUBAKRI Kamel** qui nous a suggéré ce sujet et qui a porté un intérêt, tout particulier, au travail. Nous le remercions pour sa gentillesse, et sa générosité acquise son soutien et pour le fait de nous avoir fait partager son expérience: sans son expérience avec nous, notre travail n'aurait pu aboutir à la réalisation, nous lui adresse toute notre reconnaissance pour sa patience, sa disponibilité et sa participation active à la rédaction.

Nous tenons, toujours, à remercier le professeur **BENNADJI Amine** qui nous a fait un grand honneur en présidant le jury. Nous remercions, encore, très sincèrement notre professeurs **RAHAL Mohamed** et madame **BOUHERAMMA Amina** qui ont accepté d'examiner ce mémoire.

Sans oublier les professeurs qui nous 'ont formées tout au long de notre parcours universitaire, Nous exprimons, aussi, notre gratitude envers toutes les personnes, ayant contribué de près ou de loin, à la réalisation de notre travail. Nous remercions, aussi, les étudiants de ma promotion de la spécialité Biotechnologie et microbiologie appliqué.

Pour finir, nous adresse notre remerciement à l'ensemble des étudiants du laboratoire et ainsi qu'aux innombrables que nous avons croisés durant des années.

A tous ce que nous avons oublié, mais ils se reconnaîtront ici.

Screening de l'activité antifongique de quelques souches lactiques autochtone de la viande salée séchée traditionnelle

Résumé

La présente étude a été conduite sur la viande salée séchée traditionnelle '*kaddid* ' produite dans les conditions expérimentales, dans la région de Médéa. Les résultats des analyses physicochimiques ont montré que le kaddid au cours de la maturation son pH varie entre [5.15-5.65], et d'acidité titrable totale passe de 0.4% à J_0 à une valeur de 2,2% d'acide lactique, il est aussi un produit déshydraté dont la teneur en eau passe de 65% jusqu'à 2% après 15 jours de séchage, et l'activité d'eau (a_W) change de 0.85 à 0.17 en parallèle l'humidité est de 1.5 % et d'une teneur en matière sèche de 98% au 15^e jour de séchage. Les résultats des analyses microbiologiques ont montré qu'au cours de transformation de la viande fraiche en kaddid, il y a aussi le développement des populations de la flore lactique et la flore fongique. En effet, l'identification des genres des souches lactiques isolées a montré que les isolats en nombre de 29 sont répartis aux genres *Enterococcus* (7%), *Lactobacillus* (28%), *Pediococcus* (17%), *Lactococcus* (7%) et *Leuconostoc* (41 %). D'autre part, L'identification de genres de quelques souches fongique sélectionnés a montré que les isolats en nombre de 24 dont 2 souches *Cryptococcus* (S_3J_0) et *Penicilium* (S_4J_{15}) sont utilisé pour caractériser l'activité antifongique des bactéries lactiques. Les résultats ont permis de sélectionner 23 souches lactiques ayant une activité antifongique modérée par la méthode de contacte directe, dont trois (3) souches leurs surnageants natifs possèdent une activité importante, *Lactobacillus* (S_3J_3) et *Leuconostoc* (S_1J_3), ainsi que la souche *Enterococcus* (S_6J_0) a montré une activité à la fois antimoisissure et antilevure. L'activité antifongique des surnageants neutralisés et traités avec la catalase nous a permis d'identifier les inhibiteurs majeurs particulièrement, les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et d'autres substances.

Mots clés : *Kaddid*, flore lactique, activité antifongique.

Screening of antifungal activity of lactic acid bacteria in dried salted meat (el Kaddid)

Abstract

The current study was conducted on traditional salted dried meat 'kaddid' produced under experimental conditions, prepared in Médéa region. Physicochemical analyzes showed that during the maturation of the kaddid, its pH varied between [5.15- 5.65], and its total acidity throughout the drying process was of [0.4% -2.2%] lactic acid, it is also a dehydrated product whose water content increased from [65% -2%], while its water activity (a_W) changed from [0.85-0.17] with 1.5% of humidity and 98% of dry matter content on the last day of drying.The results of the microbiological analyzes showed that the kaddid is contaminated by a multitude microflora with a large microbial load of lactic and fungal flora. The genus identification of the isolated lactic strains showed that the 29 isolates were distributed to the *Enterococcus* genus by 7%, *Lactobacillus* by 28%, *Pediococcus* by 17%, *Lactococcus* by 7% and *Leuconostoc* by 41 %.On the other hand, the genera identification of the isolated fungal strains showed that there were 24 strains and only 2 *Cryptococcus* (S_3J_0) and *Penicilium* (S_4J_{15}) were used to illustrate the antifungal activity of lactic acid bacteria. The results indicated that 23 lactic strains were selected with moderate antifungal activity, and the native supernatants of 3 of these strains had an important antifungal activity, *Lactobacillus* (S_3J_3), *Leuconostoc* (S_1J_3) and *Enterococcus* (S_6J_0) has activity anti-mold and anti-yeast.

The antifungal activity of the neutralized supernatants and the ones treated with catalase allowed the identification of the metabolites (organic acids, hydrogen peroxides and other protein substances).

Keywords: *Kaddid,* lactic flora, antifungal activity.

فحص نشاط مضاد الفطريات للبكتيريا اللبنية في اللحوم المملحة المجففة ''القديد''

ملخّص

أجريت الدراسة الحالية على اللحوم المملحة والمجففة "القديد" المنتجة تحت ظروف تجريبية، المحضرة في ولاية المدية، أظهرت نتائج التحاليل الفيزيوكيميائية أن لحم" القديد" في طور تحضيره أسّه الهيدروجيني pH يختلف ما بين[5.15 -5.65] ، ودرجة الحموضة تمر أثناء التجفيف من [0.4%- 2.2%] من حمض اللبن، بما أنه منتج مجفف فإن محتواه من الماء يمر من -02%] [65%ونسبة الماء المتاح (a_W) فيه تتغير بين [0.85-0.17] ، يمتاز القديد برطوبة تقدر ب 1.5% ومحتواه من المادة الجافة 98 % إلى آخر يوم من التجفيف . نتائج التحاليل البيولوجية أظهرت أنّ لحم القديد ملوث بعديد من البكتيريا مع تعداد ميكروبي مهم من الفطريات . أظهر تحديد الأجناس للسلالات اللّبنية المعزولة 29 عزلة ، توزع على الأجناس كالتالي *Enterococcus* 7 % ، *Lactobacillus* 28% ، *Pediococcus* 17% ، *Lactococcus* 7 % ، *Leuconostoc* 41 % . من ناحية أخرى ، تم تحديد أجناس الفطريات المعزولة حيث أظهرت 24 عزلة من بينها تم تحديد سلالتين (S_3J_0) *Cryptococcus* و *Penicilium* (S_4J_{15}) من أجل وصف نشاط مضاد للفطريات من طرف بكتيريا اللبن ، سمحت لنا هذه النتائج بتحديد 23 سلالة لبنية ذات نشاط مضاد للفطريات معتدل ، من بينها تم تحديد ثلاث سلالات، (S_6J_0) *Enterococcus* لها نشاط مضاد للفطريات و مضاد للخمائر ، (S_3J_3) *Lactobacillus* و(S_1J_3) *Leuconostoc* .حيث أظهر اختبار السائل الطافي لهاته السلالات نشاط تضادي مهم. النشاط المضاد للفطريات للسّائل الطائف المعتدل و المعالج بالكتلاز مكننا من تحديد المستقبلات (الأحماض العضوية ، بيرو كسيدات الهيدروجين، ومواد بروتينية أخرى) .

الكلمات المفتاحية : القديد، بكتيريا اللبن ، نشاط مضاد للفطريات.

Table des matières

Table des Matières
Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des photos
Liste des abréviations.
Introduction…….……...……..... 01

I. Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Les bactéries lactiques

I.1. Principales caractéristiques des bactéries lactiques……...…….. 03
I.2.Classification des bactéries lactiques…….……... 05
I.2.1. Les coques lactiques……. 06
I.2.1.1. Le genre *Aerococccus*..... 06
I.2.1.2. Les genres *Enterococcus, Vagococcus* et *Tetragenococcus*…….. 06
I.2.1.3. Les genres *Leuconostoc, Oenococcus* et *Weissella*..... 07
I.2.1.4. Les genres *Streptococcus* et *Lactococcus*…….. 07
I.2.1.5. Le genre *Pediococcus*…… 08
I.2.1.6. Le genre *Carnobacterium*……. 08
I.2.1.7. Le genre *Lactobacillus*…….. 08
I.2.1.8. Le genre *Bifidobacterium*…….. 09
I.3.Utilisation de bactéries lactiques pour la biopréservation des aliments…… 11
I.4. Propriétés fonctionnelles et technologiques recherchées…….…… 11
I.5. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques…… 12

Chapitre II : Les substances antifongiques

II.1.L'activité antifongique…….…… 13
II.2.Principaux genres fongiques……...…… 13
II.2.1.Le Genre *Penicillium*…….…… 13
II.2.2.Le genre *Aspergillus*……...…….. 14
II.3.Les bactéries lactiques antifongiques et leur spectre d'action……. 15
II.4.Les composés antifongiques des bactéries lactique……. 15
II.4.1.l'acide organique……..……. 16
II.4.1.1. Les acides organiques faibles ……...……. 16
II.4.1.2.le mécanisme……...…… 16
II.4.2. Le peroxyde d'hydrogène …….…….. 17
II.4.3.Le dioxyde de carbone …….…… 18
II.4.4. La reutérine …….…….…… 19
II.4.5.Le dipeptides cyclique…….. 20
II.4.6. Les composés protéiques …….…… 21
II.4.7.le diacétyle …….…… 22
II.5.les facteurs affectant la production…….. 22

II. Matériel et Méthodes

II.1. Objectifs de l'étude…… 23
II.2. préparation de la viande…… 23
II.2.1. La matrice alimentaire…… 23
II.2.2. Préparation du Kaddid…… 23
II.3. Analyses physicochimique complémentaire…… 24
II.3.1. Détermination du pH…… 24
II.3.2. Détermination de l'acidité titrable totale …… 24
II.3.3. Détermination de l'humidité…… 24
II.3.4. Calcul de l'activité d'eau (a_W)…… 25
II.4. Mise en place d'une collection de la flore lactique…… 25
II.4.1. Préparation de la solution mère et des dilutions…… 25
II.5. Mise en place d'une collection de la flore lactique …… 26
II.5.1. Isolement et purification …… 26
II.5.2. Caractérisation et identification préliminaire des isolats …… 26
II.5.2.1. Examens microscopiques …… 26
II.5.2.2. Recherche de la catalase …… 26
II.5.2.3. Identification physiologique des isolats lactiques…… 26
II.5.2.4. Conservation des souches…… 27
II.6. L'analyse mycologique …… 27
II.6.1. Dénombrement de la flore fongique …… 27
II.6.2. La méthode de dilution…… 28
II.6.3. Purification et conservation …… 28
II.6.4. Identification des moisissures …… 28
II.6.5. L'identification des genres : Technique de micro culture…… 28
II.7. Mise en évidence du pouvoir antifongique (test qualitatif) …… 29
II.7.1. Détermination de la nature de l'agent inhibiteur …… 29
II.7.1.1. Inhibition due à la production des acides organiques …… 30
II.7.1.2. Inhibition due au peroxyde d'hydrogène …… 30

III. Résultats et Discussion

III.1. L'analyses physicochimiques…… 32
III.1.1. pH…… 32
III.1.2.Acidité titrable totale (ATT)…… 33
III.1.3. L'humidité, la teneur en eau et la matière sèche…… 34
III.1.3. l'activité d'eau (a_w)…… 35
III.2. Analyse mycologique …… 36
III.2.1. Dénombrement et isolement des moisissures…… 36
III.2.1.1. Dénombrement de la flore fongique…… 36
III.2.1.1.1. Méthode directe (méthode de dilutions) …… 36
III.2.2. Caractérisation de quelques souches fongiques sélectionnées…… 37
III.2.2.1. Identification de quelques souches de moisissures …… 37
III.2.2.1.1.Caractérisation phénotypique des souches…… 37
III.2.2.1.2. Identification du genre par la méthode de micro-culture …… 38
III.2.2.2. Identification des levures …… 40
III.2.2.2.1. Les caractères culturaux…… 40

III.2.2.2.2. Les caractères morphologiques…… 41
III. 3. Etude de la flore lactique autochtone du kaddid…… 41
III.3.1. Dénombrement de la flore lactique…… 41
III.3.1.2. Isolement et purification des souches lactique…… 42
III.3.1.3. Pré-identification au niveau du genre des souches lactique…… 42
III.3.1.3.1. Caractérisation phénotypique des souches…… 42
III.3.1.3.2. Caractérisation microscopique……. 43
III.3.1.3.3. Production de la catalase……. 44
III.3.1.3.4. Résultats des tests physiologiques ……. 44
III.4. Sélection des isolats lactiques à activité antifongique…….. 49
III.5.. Etude de la nature de l'agent inhibiteur des souches actives ……. 51
III.5.1.Caractérisation partielle des métabolites antifongiques ……. 53
Conclusion et perspectives..... 55
Références bibliographiques
Annexes

Liste des Tableaux

Tableau 1. Genres commun des Bactéries lactiques et leurs caractères différentiels……..... 10
Tableau 2. Caractères phénotypiques de quelques moisissures sélectionnées…….…..... 38
Tableau 3. L'identification microscopique de quelques souches de moisissures…….…….. 39
Tableau 4. Identification macroscopique et microscopique des levures……...…….. 40
Tableau 5. Identification du genre de la collection des souches lactiques…….…… 47
Tableau 6. Activité antifongique des souches lactiques par contact direct…….……... 50
Tableau 7. Détermination de l'activité antifongique des surnageants natifs (mm)…… 52
Tableau 8. Activité inhibitrice des surnageants traités (mm)……..…… 53

Liste des Figures

Figure 1. Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques…… 04
Figure 2. Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus, Bacillus, Listeria* et *Staphylococcus*..... 05
Figure 3. Caractères morphologiques des *Penicillium*……..…… 14
Figure 4. Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus.*…… 15
Figure 5. Réactions enzymatiques de la formation du 3-hydroxypropionaldehyde (3HPA) à Partir du glycérol…… 19
Figure 6. Dipeptides cycliques antifongiques identifiés dans le surnageant de culture de *Lactobacillusp lantar*……..... 21
Figure 7. Schéma de différenciation des genres des bactéries lactiques…… 27
Figure 8. Arbre décisionnel des modalités d'identification des produits responsables de l'inhibition portant sur la question de la croissance des souches indicatrices……. 30
Figure 9. Résultats de l'évaluation du pH au cours de séchage du kaddid……. 33
Figure 10. Résultats de l'évaluation d'ATT au cours de séchage de kaddid…….. 33
Figure 11. Résultats de l'évaluation de l'humidité, teneur en eau et matière sèche au cours dela maturation du kaddid…… 35
Figure 12. Résultats de l'évaluation d'a_w au cours de séchage et maturation du kaddid……. 35
Figure 13. Résultats de l'évaluation de la flore fongique au cours de séchage du kaddid…….. 37
Figure 14. Résultats de l'évolution de la flore lactique au cours de la maturation du kaddid..... ……. 41
Figure 15. Répartition des genres de la collection lactique (%) au cours de la maturation du kaddid……..... 46
Figure 16. Répartition des genres de la collection lactique (%)…….. 48

Liste des Photos

Photo 1. Technique de Micro culture pour l'identification microscopique des moisissures…….. 29
Photo 2. L'aspect macroscopique de la souche sur milieu MRS…… 43
Photo 3. Aspect d'une culture pure dans un milieu liquide…… 43
Photo 4. Observation microscopique des souches lactiques avec un grossissement (G:10x100). ……... 44
Photo 5. Résultat des tests physiologique (différents pH, et concentrations en NaCL)……. 45
Photo 6. Le type fermentaire du glucose des souches lactiques sur milieu Gibson et Abdelmalek…… 45
Photo 7. Inhibition de *Penicillium* (S_4J_{15}) et *Cryptococcus* (S_3J_0) par *Lactobacillus* et *Enterococcus* …… 49

Liste des Abréviations

- ***Unité de mesure :***

°D : Degré dornic
N : Normalité
U : Unité
m/s : Mètre par seconde.

- ***Autres abréviations :***

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomique
ATP : Adénosine triphosphate
ATT : Acidité titrable totale
a_W : Activity of water (Activité d'eau)
BL : Bactéries lactiques
CAT : La catalase
GN : Gélose nutritive
GSH : le glutathion
MRS : de Man-Rogosa et Sharp
N : Nombre de colonies
OGA : Gélose glucose à l'oxytétracyclique
PBS : Tampon phosphate saline
PDA : Potato dextrose agar
pH : Potentiel d'Hydrogène
ROS : Mode enzymatique de détoxification des espèces oxygènes réactives
SOD : Superoxydes dismutases
TE : Teneur en eau
TH : Teneur en humidité
TSE : Tryptone- sel- eau
UFC : Unité Formant Colonie
(3-HPA) : La reutérine ou 3-hydroxypropionaldehyde

Introduction

Les produits traditionnels font partie du patrimoine de chaque peuple, ils contribuent à garder son identité nationale. Nous rencontrons et utilisons des recettes transmises d'une génération à une autre. Parmi ces aliments, les produits carnés traditionnels, dont il existe plus de 1000 variétés produites à l'échelle industrielle **(Daoudi** et *al.*, **2006).**

En Algérie, les produits carnés traditionnels sont peu nombreux et ne sont pas tous recensés, ils sont restés confiner à leurs niches géographiques d'origine tel que *Kaddid* ou *Guiddid*, qui se prépare par le salage, ajout des épices et séchage pendant les périodes où la viande est disponible en grandes quantités. La préparation du produit a pour objectif de conserver la viande contre la détérioration, qui peut se produire rapidement. Le procédé n'est pas employé comme une technologie de transformation, mais comme une alternative pour conserver l'excès de la viande **(Bennani** et *al*., **1995; Bennani** et *al*., **2000).** Malheureusement plusieurs d'entre eux sont en voie de disparition, pour différentes raisons dont l'indisponibilité fourragère qui influe sur le prix de la viande, l'exode rurale et le changement des habitudes alimentaires. **(Igene** et **Abulu, 1984 ; Buzzini** et *al.*, **1994; Bennani** et al., **2000 ; Drosinos** et *al*., **2005 ; Whitesel ,2011; Petit** et al., **2013).**

La qualité des viandes fermentées est étroitement liée au processus de maturation qui se déroule durant le séchage. Ce processus, qui confère au produit sa fermeté et élasticité particulières, sa couleur et sa flaveur, se caractérise par un complexe des réactions physique, chimique associées avec le développement de la flore microbienne. Les résultats de ces interactions sont le changement de la flore microbienne initiale, réduction de nitrate en nitrite et puis en oxyde nitrique, la solubilisation et la gélification des protéines myofibrillaires et sarcoplasmique, la protéolyse, la lipolyse, et le phénomène d'oxydation et de déshydratation **(Casaburi** et *al*., **2007)**.

La préservation des aliments se base essentiellement sur le retard, la prévention ou l'inhibition de la croissance des microorganismes contaminants. Les méthodes physiques et chimiques de préservation provoquent des altérations de qualités nutritionnelles, et organoleptiques des aliments, et une diminution de leurs utilité suite au développement des résistances des germes pathogènes, cette résistance est attribuable à l'utilisation abusive et souvent prolongés des produits chimiques, ce qui permet aux souches de développer des mécanismes de résistances, faces à ces problèmes, la recherche scientifique s'oriente vers une nouvelle théorie, qui est la biopréservation **(Gould, 2000).**

Selon **Djosson, (2011)** la biopréservation est une alternative très prometteuse, ceci par l'efficacité d'action et l'omniprésence des agents antagonistes, leur diversité et leur persistance dans l'environnement. Des travaux ont rapporté l'existence au sein de certains microorganismes des souches capables de contrôler la croissance fongiques telles que *Bacillus*, *Streptomyces*, et *Trichoderma*, etc, mais certaines d'entre eux sont responsables des problèmes sanitaires.

Les bactéries lactiques (BL), non seulement connues pour leur innocuité, mais aussi par leurs rôles dans la conservation des viandes, et sont considérées comme un groupe de micro-organismes technologiquement fondamental. Elles peuvent diminuer le pH par production d'acide lactique et des acides organiques, peuvent produire les bactériocines qui empêchent la croissance des

microorganismes pathogènes et d'altération qui renforcent cette conservation**,** fournissent une diversité des propriétés sensorielles par modification de matière première, contribuent au développement de la flaveur, la couleur et de la texture en améliorent la sécurité, la stabilité et la durée de vie des viandes et des produits a base de viande **(Babić** et *al*., **2011)**.

Le challenge principal dans la sélection des cultures starters est d'améliorer la sécurité des aliments, et de préserver la qualité sensorielle typique des produits traditionnels à base de viandes. Les micro-organismes les plus prometteurs comme cultures starters sont ceux qui sont choisis parmi la flore microbienne qualifiée autochtone en raison de l'influence du climat et de la végétation de la région où ils sont produits, puisqu'elles sont bien adaptées à l'environnement de viande et au processus de fabrication spécifique **(Leroy** et *al*., **2006; Talon** et *al*., **2008).**

Jusqu'à ce jour, les recherches publiées sur le Kaddid Tunisien ou Marocain ont principalement porté sur la qualité physico-chimique et microbiologique **(Bennani et** *al*.**, 1995, Zaier et** *al*.**, 2011),** la préparation expérimentale et l'optimisation du procédé salage/séchage **(Bennani et** *al*.**, 2000, Hajji et** *al*.**, 2011, Chabbouh et** *al*.**, 2012),** diversité des bactéries lactiques dans le Kaddid **(Ben Belgacem et** *al*.**, 2008),** étude sur l'activité antibactérienne et les propriétés technologique des bactéries lactiques isolées de Kaddid **(Ben Belgacem et** *al*.**, 2010).** Caractérisation des propriétés technologiques des souches isolées de Kaddid **(Essid et** *al*.**, 2009).**

À notre connaissance, le kaddid Algérien n'a pas fait l'objet d'étude scientifique rigoureuse, mérite d'être connu en Algérie, situé par rapport aux autres produits artisanaux du monde et mieux le valorisé. Notre étude s'inscrit dans cette démarche et s'articule autour des volets scientifiques suivants : caractérisation de la flore lactique qui se développe dans le kaddid préparé expérimentalement, et la recherche des souches potentiellement antifongique vis-à-vis des souches indicatrices isolées de même produit, et enfin la caractérisation partielle des métabolites antifongique.

Notre présent manuscrit est divisé en quatre parties, la première est consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour de deux chapitres qui vont traiter les principales caractéristiques des bactéries lactiques, et les métabolites antifongiques des bactéries lactiques. La deuxième partie va regrouper les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail. Les résultats obtenus sont alors exposés et discutés dans la troisième partie. Une conclusion générale résumera les principaux acquis de ce travail avec les perspectives envisagées pour la poursuite de la recherche.

Chapitre I.

Les bactéries lactiques

Chapitre I. Les bactéries lactiques

I.1. Principales caractéristiques des bactéries lactiques

Le terme de bactéries lactiques (BL) est intimement associé aux bactéries impliquées dans la fermentation des aliments pour l'homme et l'animal. La première culture pure était des *Bacterium lactis* probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par Lister en 1873. **(Guiraud *et al.*, 2003 ; Limsowtin** *et al.,* **2004 ; Axelsson, 2004)**.

Elles sont des microorganismes ubiquitaires susceptibles d'être retrouvés dans tous types d'habitat. Elles accompagnent l'activité humaine au quotidien, en temps que bactéries de la flore commensale, de la flore intestinale ou de la flore alimentaire, ont pour habitat de nombreux milieux naturels, des végétaux (plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales, fèces et dans le lait). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels **(de Roissart, 1986).**

Ce sont des coques ou bâtonnets ou coccobacilles à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, anaérobies, mais aéro-tolérantes, catalase négative, (certaines souches possèdent une pseudo-catalase, oxydase négative. ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase **(Ouadghiri** *et al.*, **2005)**. Il existe d'autres bactéries produisant de l'acide lactique mais qui ne sont pas considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques. C'est le cas, par exemple, de *Bacillus* et *Sporolactobacillus* qui sont des bactéries Gram (+) sporulées **(Axelsson et** *al.***, 2004 ; Liu et** *al.***, 2014**).

Une caractéristique commune permet cependant de les unifier en un seul et vaste groupe:

- ✓ Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui,en utilisant les glucides, Elles sont de métabolisme chimio-organotrophes (**Ström et** *al.*, **2005** ; **Von Wright et Axelsson, 2012**).voir figure 1.

- ✓ Leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique **(Axelsson ,2004).**
- ✓ Elles produisent l'acide lactique comme produit final principal de la fermentation des hydrates de carbone. La fermentation est dite homolactique si l'acide lactique est le produit majoritairement formé (> 85 % du pyruvate converti en lactate) et hétéro-lactique si d'autres composés, tels l'acide acétique, l'éthanol, le formiate et le CO_2, sont synthétisés **(Salvetti** et *al.***, 2013).**
- ✓ Certaines espèces ou certaines souches peuvent en outre produire de l'acide formique ou de l'acide succinique (**Hammes et Hertel, 2009**).
- ✓ Le contenu en GC de leur ADN varie de 33 à 54%, ce qui les classe dans les bactéries à faible pourcentage de GC **(Muto & Osawa, 1987).**
- ✓ Elles possèdent souvent des exigences nutritionnelles complexe en terme d'acides aminés, de peptides, de vitamines, de sels, d'acides gras et de sucre **(Dellaglio** *et al.*, **1994).**
- ✓ Elles survivent dans un milieu à faible a_w, et résistent à l'éthanol (10-15 % éthanol) et au CO_2.
- ✓ Elles ont des besoins complexes en facteurs de croissance tels que vitamine B, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques. Les milieux de culture sont complexes et dits "riches". Il est donc difficile d'obtenir de bons milieux sélectifs. Seul l'abaissement du pH sera souvent utilisé comme agent de sélection.

Ces propriétés sont utilisées en agro alimentaire pour transformer la matière et empêcher le développement de la plupart des bactéries d'altération ou des pathogènes. Il apparaît donc que les produits fermentés puissent être considérés comme "à faible risque" vis-à-vis des pathogènes courants. Cependant, il n'est pas exclu que des souches particulières d'une espèce de bactérie indésirable puissent se développer. D'autres microorganismes sont également connus pour se développer à pH acide, comme de nombreuses levures et moisissures **(Nielsen** *et al.*, **2008 ; Sachindra** *et al.*, **2005)**.

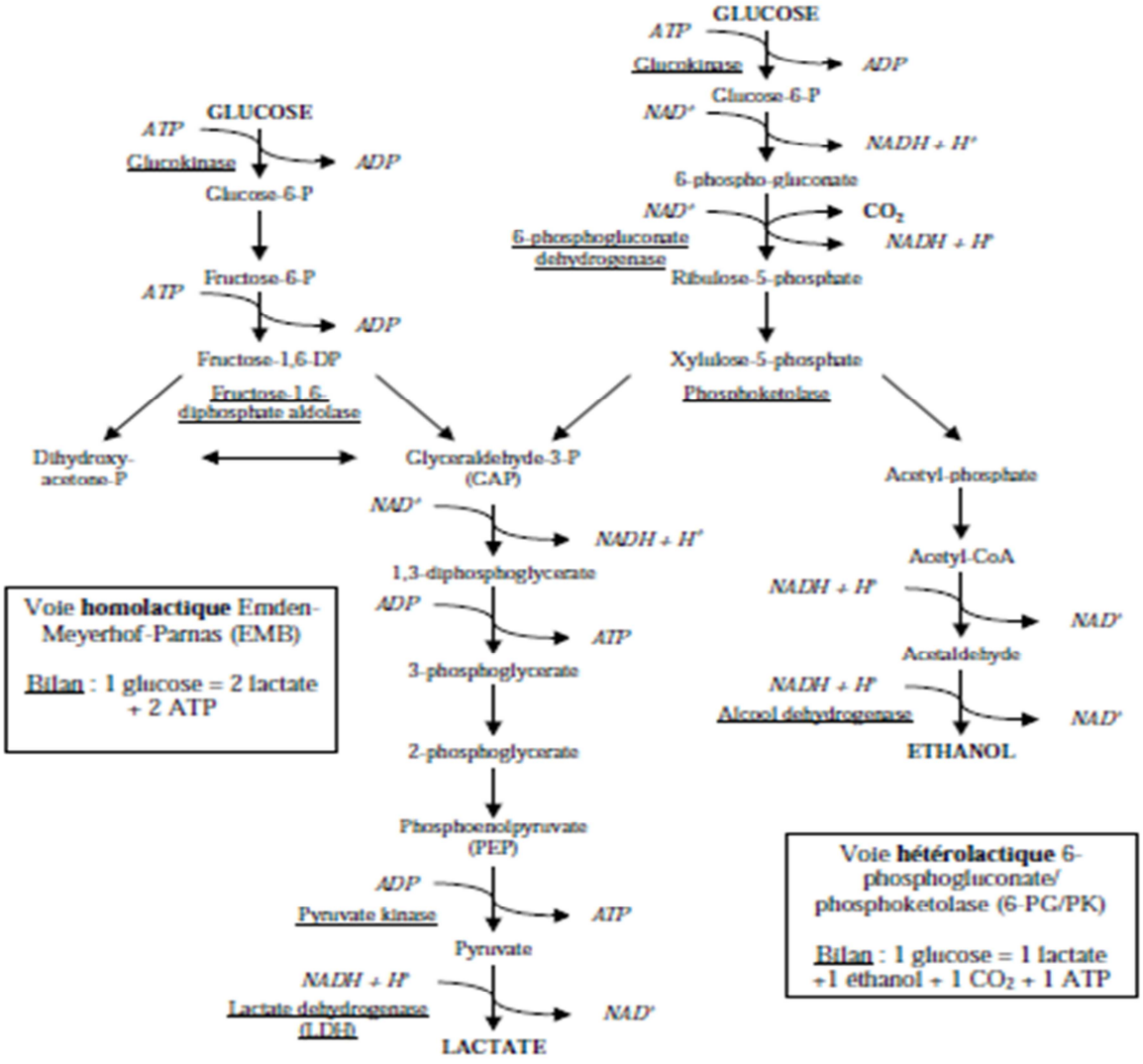


Figure 1. Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques **(adapté de Dellaglio** *et al.*, **1994).**

I.2.Classification des bactéries lactiques

Le groupe des BL a été défini par **Orla-Jensen (1919) (Krieg, 2001),** La taxonomie à longtemps reposé sur les critères morphologiques et biochimiques permettant de différencier les espèces et de caractériser des variantes au sein d'une même espèce. Ces testes sont:

- Le type de gram, la morphologique et la disposition cellulaire.
- Les différents métabolismes glucidiques, protéiques, lipidiques, le caractère fermentaire ;
- La croissance des cellules sur des milieux hostiles.
- Et la synthèse d'enzymes (de protéases), de métabolites (exopolysaccharides), de bactériocines, la résistance aux bactériophages.

Puis, des études basées sur les critères moléculaires ont permis de classer les espèces.

Les BL peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella,* récemment décrit, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques **(Ho** et *al.*, **2007)** figure 2.

Les genres formant les tétrades sont les *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus* **(Axelsson, 2004).**

Dans la pratique, le test de production de gaz à partir du glucose permettra de discriminer les groupes. Les *Leuconostoc, Oenococcus, Weissella* et un sous-groupe de *Lactobacillus* sont hétérofermentaires, toutes les autres bactéries lactiques sont homofermentaires **(König** et **Fröhlich, 2009).**

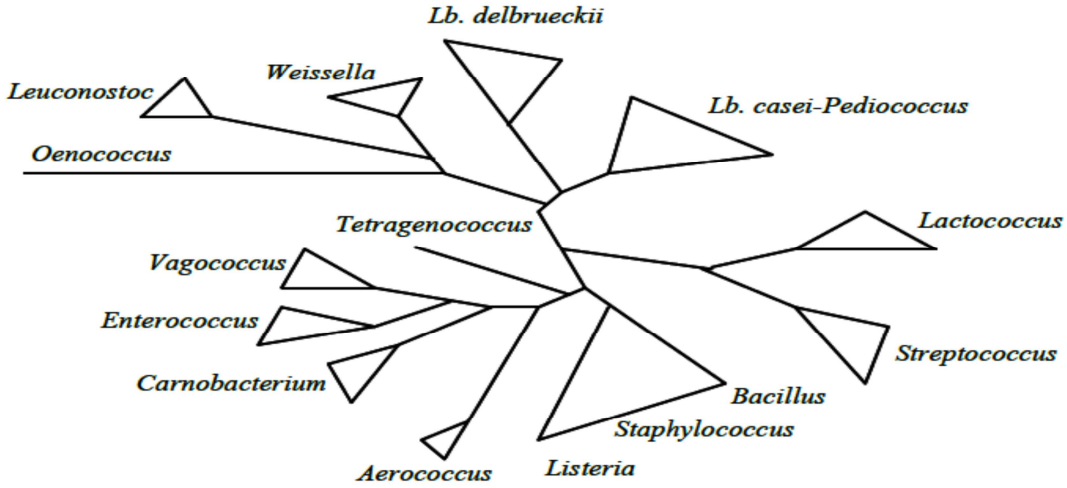


Figure 2. Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus, Bacillus, Listeria* et *Staphylococcus* d'après **Axelsson (2004).**

La croissance à différentes températures est principalement utilisée pour distinguer les coques entre eux. Les *Enterococcus* classiques croissent entre 10 °C et 45 °C, les *Lactococcus* et *Vagococcus* à 10 °C, mais pas à 45 °C. En général, les *Streptococcus* ne se développent pas à 10°C, leur croissance à 45 °C dépend de l'espèce. La tolérance au sel peut également être utilisée pour différencier les *Enterococcus, Lactococcus/Vagococcus* et *Streptococcus.* Seul le genre *Tetragenococcus* tolère 18 % en NaCl. La tolérance aux conditions acides et/ou alcalines peut

également être utilisée. Les *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Tetragenococcus* et *Vagococcus* peuvent se développer à des pH plus élevés que les autres bactéries lactiques. Les *Pediococcus* peuvent être confondus avec les *Aerococcus* à cause de leur similarité morphologique. Toutefois, les *Pediococcus,* plus aérotolérants que les *Aerococcus,* et qui poussent bien en anaérobiose, sont en opposition avec la nature micro aérophile des *Aerococcus* (Tableau 1).

Les caractéristiques des principaux genres sont décrites brièvement ci-après :

I.2.1. Les coques lactiques

Elles appartiennent à la famille des *Streptococcaceae*. Les cellules sont groupées en paires ou en chaînes et de longueurs variables. La différenciation des genres est basée sur l'arrangement des cellules et sur le type de fermentation lactique (homo ou hétérolactique).

Les coques lactiques ont des exigences nutritives parfois complexes. Certains ont des activités protéasiques et peptidasiques. Actuellement, ils regroupent les genres : *Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Aerococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Weissella* **(Stiles** et **Holzapfel, 1997).**

I.2.1.1. Le genre *Aerococccus*

Ce sont des coques formées de cellules groupées en tétrades. Le genre *Aerococccus* qui contient cinq espèces est généralement moins intéressant dans l'agroalimentaire. Cependant, une étude a suggéré que ces bactéries pourraient être responsables du verdissement des produits carnés cuits **(Peirson** et *al.*, **2003).**

I.2.1.2. Les genres *Enterococcus, Vagococcus* et *Tetragenococcus*

Le genre *Enterococcus* regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β et qui appartiennent au groupe D. Ce sont des commensaux de l'intestin. Les espèces rencontrees dans l'alimentation sont essentiellement *En.faecalis* et les espèces proches (*En.durans* et *En.bovis*). Les entérocoques sont des coques qui peuvent être mobiles, homofermentaires, généralement différencies par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, ils croissent entre 10 °C et 45 °C, pH élevé ou bas et à la forte salinité **(Tamime, 2002 ; Ho** et *al.*, **2007).** Ces bactéries sont également trouvées dans les autres produits fermentés tels que les fromages, les saucisses et les olives **(Franz** et *al.*, **2003).**

Les espèces du nouveau genre *Vagococcus* sont facilement confondues avec les lactocoques au niveau morphologique, mais ces deux genres sont clairement distincts par leur composition en acides gras. Certaines espèces de *Vagococcus* sont mobiles. Les amorces d'oligonucleotides spécifiques de ce genre et ses espèces sont disponibles, ce qui rend l'identification des bactéries de ce genre fiable et réalisable **(Ammor** et *al.*, **2005b ; Endo** et **Okada, 2005).**

Seulement deux espèces de *Tetragenococcus* sont connues : *Te. Halophilus* (précédemment considérées comme *Pe.halophilus*) et *Te.muriaticus*. Les *Enterococcus solitarius* sont phylogénétiquement liés au *Tetragenococcus*. Ces bactéries résistent à des concentrations élevées

en sel (supérieures à 18 % NaCl) et en sont dépendantes pour leur croissance. Les espèces *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration de sel élevée par exemple les sauces de soja **(Tosukhowong** et *al.*, **2005 ; Masuda** et *al.*, **2008).**

I.2.1.3. Les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Les *Leuconostoc* sont hétérofermentaires, produisent de l'acide lactique, du CO_2 et de l'éthanol. Ce sont des coques groupes en paires ou en chaines, catalase (-). Leur température optimale de croissance se situe entre 25 °C et 30 °C. Leur croissance est toujours lente. Le développement des *Leuconostoc* entraine souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu **(Guiraud, 2003).** Certaines espèces de *Ln.carnosum* ont été proposées pour la bioconservation des produits carnés emballés sous vide et entreposés au froid, contre *L.monocytogenes* **(Budde** et *al.*, **2003).**

Seulement deux espèces *Oenococus oeni* et *Oe. kitahareae* du genre *Oenococus* sont décrites **(Endo** et **Okada, 2006).** La présence d'*Oe.oeni* dans le moût de raisin viendrait principalement du matériel vinaire, c'est la bactérie lactique la plus apte à résister et à se développer après la fermentation alcoolique en conditions œnologiques **(Alexandre** et *al*., **2008).**

Plusieurs espèces de *Weissella* sont associées à la viande et les produits carnés. Ces bactéries peuvent être des agents d'altération à basse température. Les *Weissella thaïlandensis* ont été isolés de poisson fermenté de Thaïlande **(Tanasupawat** et *al.*, **2000). Koort** et *al.* **(2006)** ont identifié les *W. viridescens* sur du « Morcilla de Burgos ≫ un produit carne cuit d'Espagne par l'analyse des séquences de ARNr 16S.

I.2.1.4. Les genres *Streptococcus* et *Lactococcus*

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transférée au groupe des streptocoques oraux a cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* **(Smit** et *al*., **2005).** La résistance à la température, la capacité à croître à 52 °C et le nombre limité des hydrates de carbone permettent de distinguer les *St.thermophilus* de la plupart des autres streptocoques **(Tagg** et *al*., **2012).**

Le genre *Lactococcus* comprend 7 espèces et 4 sous-espèces **(Euzéby, 2011).** Les lactocoques sont des bactéries lactiques généralement isolées des produits végétaux ou laitiers **(Pilet** et *al.*, **2005).** Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L (+), seul *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30 °C, capable de se développer à 10 °C, mais pas à 45 °C. Ne poussent pas à pH 9,6 ou en présence de 6,5 % de NaCl. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3 % de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine **(Tamime, 2002).**

I.2.1.5. Le genre *Pediococcus*

Les *Pediococcus* peuvent être décrits comme les seules coques lactiques acidophiles et homofermentaires. Ils se divisent alternativement dans deux plans ce qui aboutit à la formation de tétrades **(Huys** et *al*., **2012)**. Les *Pe.acidilactici* et *Pe.pentosaceus* ont démontré leur utilité dans l'élaboration de plusieurs produits carnes fermentes naturels. Ceci a conduit a de nombreuse sélections de souches et l'utilisation comme agents antibacteriens ou probiotiques dans la fabrication de produits carnés **(Schneider** et *al.,* **2006 ; Albano** et *al.,* **2007).** Fermentes, l'hydrolyse de l'arginine, la croissance a différents pH (4,5 a 7,0), et la conformation de l'acide lactique produit. Les *Pe.pentosaceus* et *Pe.acidilactici* sont difficiles à distinguer entre eux par ces caractéristiques, mais peuvent être différenciés par l'ARNr 16S **(Renouf** et *al.,* **2006).**

I.2.1.6. Le genre *Carnobacterium*

Les *Carnobacterium* sont des bacilles minces, droits ou légèrement incurvés, isolées ou groupées par deux (formant un V caractéristique), hétérofermentaires, mobiles ou immobiles, aéroanaérobies **(Carr** et *al.,* **2002).** Souvent trouves dans les viandes de bœuf, de poisson et de volaille emballées sous vide et stockées à basse température **(Joffraud** et *al.*, **2006).** En général, les *Carnobacterium* peuvent croître à un pH relativement élevé et ils sont capables de se développer à faible température **(Jones** et *al.*, **2004).** En outre, leur composition en acides gras diffère de celle des lactobacilles **(Huys** et *al*., **2012). Larrouture-Thiveyrat** et *al.* **(2003)** ont démontré la contribution des *C.piscicola* dans la formation de la flaveur des saucisses fermentées.

I.2.1.7. Le genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) et parfois prendre la forme coccobacilles sous certaines conditions de croissance, souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40 °C, à un pH 5,5-5,8 elles peuvent se développer à pH inférieur à 5 et sur une gamme de température entre 5-53° C, micro-aérophiles ou anaérobies **(Hofvendahl** et **Hahn-Hägerdal, 2000).**

Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux **(Barrangou** et *al*., **2012)**, ils sont acidophiles. Ils sont généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques **(Ammor** et **Mayo, 2007).**

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par **Orla-Jensen (1919)** en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel **(Tamime, 2002)** :

- **Groupe I** « *Thermobacterium* **»** : comprends les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45 °C, mais pas à 15 °C. Les espèces les plus frequentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb.helveticus, Lb.delbrueckii, Lb.acidophilus.*
- **Groupe II** « *Streptobacterium* **»** : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces

les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb.casei, Lb.curvatus, Lb.sakei, Lb.plantarum* et *Lb.coryniformis.*

- **Groupe III «** *Betabacterium* **»** : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb.fermentum, Lb.brevis et Lb.sanfransisco.*

En 2012, la taxonomie du genre *Lactobacillus* a été encore mise à jour et des espèces dans le genre ont été encore groupées d'un point de vue phylogénique, elle a révélé 152 espèces, divisées en 15 groupes qui contiennent trois espèces ou plus, 4 groupes contiennent seulement deux espèces et 10 simples lignes avec une espèce, par exemple *: Lb.reuteri* group (reu), *Lb.buchneri* group (buch), *Lb.alimentarius-Lb.farciminis* group (al-far), ; *Lb.casei* group(casei), *Lb.sakei* group (sakei), *Lb.coryniformis* group (cor), *Lb.plantarum* group (plan), etc**.(Salvitti** et *al*., **2012).**

I.2.1.8. Le genre *Bifidobacterium*

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactique grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal. Ces microorganismes sont phylogénétiquement sans rapport avec ces dernières. Ils sont davantage liés au phylum *Actinobacteria* (anciennement *Actinomycètes*) des bactéries Gram positif dont l'ADN est à haut pourcentage de G+C. Les bifidobactéries se caractérisent par leur forme très irrégulière souvent en forme « Y », mais pouvant être coccoïdes, la présence d'une enzyme, le fructose -6-phosphate phosphocétolase, celle-ci leur permet de fermenter les hexoses en produisant de l'acide acétique et de l'acide lactique. Leur température de croissance varie de 36 °C à 43 °C **(Pilet** et *al.*, **2005 ; Ho** et *al.*, **2007).** *Bifidobacterium* a été utilisé dans le salami Hongrois pour inhiber la croissance des *L.monocytogenes* et *E.coli* O111 **(Pidcock** et *al.*, **2002).**

Tableau 1. Genres commun des Bactéries lactiques et leurs caractères différentiels **(Von Wright** et **Axelsson, 2012).**

Famille	Genre	Caractéristiques									
		forme	CO2 de Glucose	Croissance à 10 °C	Croissance à 45 °C	Croissance à 6,5 % NaCl	Croissance à 18 % NaCl	Croissance à pH 4,4	Croissance à pH 9,6	Type d'acide lactique	Type de fermentation
Aerococcaceae	*Aerococcus*	Cocci (Tétrades)	-	+	-	+	-	-	+	L	homofermentaire
Carnobacteriaceae	*Carnobacterium*	Bacilles	- [c]	+	-	ND[d]	-	ND	-	L	hétérofermentaire
Enterococcaceae	*Enterococcus*	Cocci	-	+	+	+	-	+	+	L	homofermentaire
	Tetragenococcus	Cocci (Tétrades)	-	+	-	+	+	-	+	L	homofermentaire
	Vagococcus	Cocci (Tétrades)	-	+	-	-	-	variable	-	L	homofermentaire
Lactobacillaceae	*Lactobacillus*	Bacilles	Variable	variable	variable	variable	-	Variable	-	D, L, DL e	Homo ou hétéro
	Pediococcus	Cocci (Tétrades)	-	variable	variable	variable	-	+	-	L, DL e	homofermentaire
Leuconostocaecae	*Leuconostoc*	Coccia	+	+	-	variable	-	variable	-	D	hétérofermentaire
	Oenococcus	Cocci	+	+	-	variable	-	variable	-	D	hétérofermentaire
	Weissella	Cocci/ Bacillesb	+	+	-	variable	-	variable	-	D, DL e	hétérofermentaire
Streptococcaceae	*Lactococcus* a	Cocci	-	+	-	-	-	variable	-	L	homofermentaire
	Streptococcus	Cocci	-	-	variable	-	-	-	-	L	homofermentaire

ND : non déterminé ; a Dans l'ancienne litterature les lactocoques sont referees aux Streptocoques group N ; b Certains *Weissella* sont des cocci ou des bacilles ;
c Faible quantité de CO2 selon le milieu ; d Ne peuvent pas se développer dans 8 % NaCl ; e Production d'acide lactique D, L ou DL est variable selon l'espece.

I.3.Utilisation de bactéries lactiques pour la biopréservation des aliments

Les bactéries lactiques (BL) sont les bactéries les plus intéressantes pour la biopréservation. De nombreuses études ont montré leur potentiel dans toutes sortes de produits alimentaires, elles sont résponsables de la fermentation de produits alimentaires, qu'ils soient d'origine carnée, laitière ou végétale. Certaines BL peuvent se développer rapidement dans les produits réfrigérés et emballés sous vide ou sous atmosphère modifiée. Certaines souches produisent des composés antimicrobiens (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyle et bactériocines) et elles sont généralement reconnues sans risques dans l'alimentation. De surcroît, elles disposent auprès des consommateurs d'une image naturelle et bénéfique pour la santé, due à leur présence dans des produits laitiers et aux effets probiotiques de certaines souches **(pour revue, voir Guinane** *et al.*, **2005).**

Parmi les composés inhibiteurs issus du métabolisme des bactéries lactiques on peut citer les acides lactique et acétique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocines. Les acides organiques sont les produits directs de la fermentation. Leur libération dans le milieu entraîne un abaissement du pH qui ralentit la croissance bactérienne. Ainsi **Wilson et** *al.* **(2005**) ont démontré que l'inhibition de *L. monocytogenes* dans des produits végétaux par une souche de *Lb. plantarum* était due à la production d'acide lactique. Cependant dans certains produits une forte diminution du pH peut être considérée comme un signe d'altération. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est produit en présence d'oxygène sous l'action d'enzymes telles que la NADH oxydase, le pyruvate oxydase ou le superoxyde dismutase.

Les BL ne disposant pas de catalase pour le réduire, ce composé s'accumule dans le milieu. Son potentiel d'oxydation élevé lui permet d'altérer les acides nucléiques et d'oxyder les lipides, entraînant une inhibition des microorganismes. Le diacétyle est un produit de la fermentation du citrate. Il est produit principalement par les bactéries des genres *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Son action aromatique est recherchée dans certains fromages tels que le *Gouda*. Son activité inhibitrice est en général peu importante, due à la faible quantité présente dans les produits.

I.4. Propriétés fonctionnelles et technologiques recherchées

L'utilisation des BL pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques. Celles-ci recouvrent les propriétés suivantes : activité acidifiante, propriétés enzymatiques (activité protéolytique, peptidasique et lypolytique), production de métabolites d'intérêt telle que la peroxyde d'hydrogène, les acides organiques et les bactériocines.

D'autres qualités ont depuis été associées aux bactéries lactiques lorsqu'elles sont associées aux produits alimentaires comme l'augmentation des valeurs nutritionnels des aliments, la réduction de la formation de produits toxiques et la propriété de probiotique. En plus de la propriété de bioconservation, plusieurs propriétés ont été attribuées aux bactéries productrices de bactériocines 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).**

La capacité des BL à synthétiser des EPS joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés **(Welman** *et al.*, **2003)**. Ces composés polymères sont généralement considérés comme des agents épaississants naturels en industrie alimentaire.

I.5. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques.

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques qui sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie hétérofermentaire. Grâce à cette production d'acides organiques, les BL diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe. Leur compétitivité est améliorée étant donné leur grande tolérance aux pH bas extra et intracellulaires. Outre la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération du proton, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions, les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires fonctions **(Kostinek** *et al.*, **2005).**

Le dioxyde de carbone est formé pendant la fermentation hétéro lactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité ce qui peut inhibées la développent de souche pathogènes **(Ammor** *et al.*, **2006)**.

Le diacétyl ($C_4H_6O_2$) est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus* sp, *Leuconostoc* sp, *Lactobacillus* sp, et *Pediococcus* sp, il un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif. Les concentrations nécessaires à l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm, et sont supérieures à celles présentes dans le beurre et susceptibles de provoquer son arôme **(Dortu** *et al.*, **2008)**.

Chapitre II.

Les Métabolites antifongiques des Bactéries lactiques

Chapitre II. Les Métabolites antifongiques des Bactéries lactiques

II.1. L'activité antifongique

Les moisissures constituent une flore d'altération naturellement présentes sur les aliments tels que les produits laitiers, le fromage, le pain, la viande, les produits agricoles en stockage et les ensilages **(Bonestroo** et *al.,* **1993 ; Filtenborg** et *al.,* **1996)**. Les genres les plus courants sont *Penicillium* et *Aspergillus* et *Fusarium* **(Jefca, 2001).** L'idée de l'utilisation des bactéries lactiques (BL) pour le contrôle de la croissance des moisissures dans les aliments vient de la cohabitation entre bactéries et moisissures sur ces aliments, mais aussi de la résistance croissante des moisissures aux antibiotiques Ainsi certaines souches de *Penicillium*, *Saccharomyces* et *Zygosaccharomyces* se développent bien en présence de sorbate de potassium et de benzoate **(Nielsen** et **Boer, 2000 ; Davidson, 2001).** De plus le nombre de moisissures dégradant le sorbate est sans cesse croissant **(Nielsen** et **Boer, 2000).**

Les recherches sur l'activité antifongique chez les BL n'ont commencé qu'à la fin des années 50 et au début des années 60, avec **Guillo (1958)** qui élabora un produit actif contre *Candida albicans* par *Lactobacillus acidophilus*, et **Marth** et **Hussong (1963)** qui ont testé le filtrat de *Leuconostoc citrovarum* ayant une activité antibactérienne sur quatre espèces de levures mais tous les filtrats ont été jugés inactifs. **Collins** et **Hardt (1980)** ont constaté que le filtrat stérilisé d'une culture de *Lb.acidophilus* a pu légèrement retarder la croissance de *C.albicans* par rapport au bouillon fraichement préparé. **Wisseman** et **Marth (1981)** ont démontré l'inhibition d'*Aspergillus parasiticus* par *Streptococcus* lactis, sans identification de la molécule inhibitrice.

Actuellement, plusieurs équipes de recherches ont pu identifier les substances antifongiques produites par les BL ainsi que l'effet synergique de l'acétate de sodium contenu dans le milieu de culture avec las acides organiques produits par ces bactéries **(stile** et *al.,* **2002)**. Outre que les métabolites antifongiques, la compétition nutritionnelles à été prouvé aussi comme un obstacle antifongique **(Bayrock et Ingledew, 2004).**

II.2.Principaux genres fongiques

Les genres les plus importants de point de vue économique et médical sont les *Aspergillus*, les *Penicillium* et les *Fusarium* qui représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux et d'origine animale.

II.2.1.Le Genre *Penicillium*

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des *Ascomycètes*. Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (**Pitt, 1988**). Les *Penicillium* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphages, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les céréales.

Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux ou l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, à des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées.

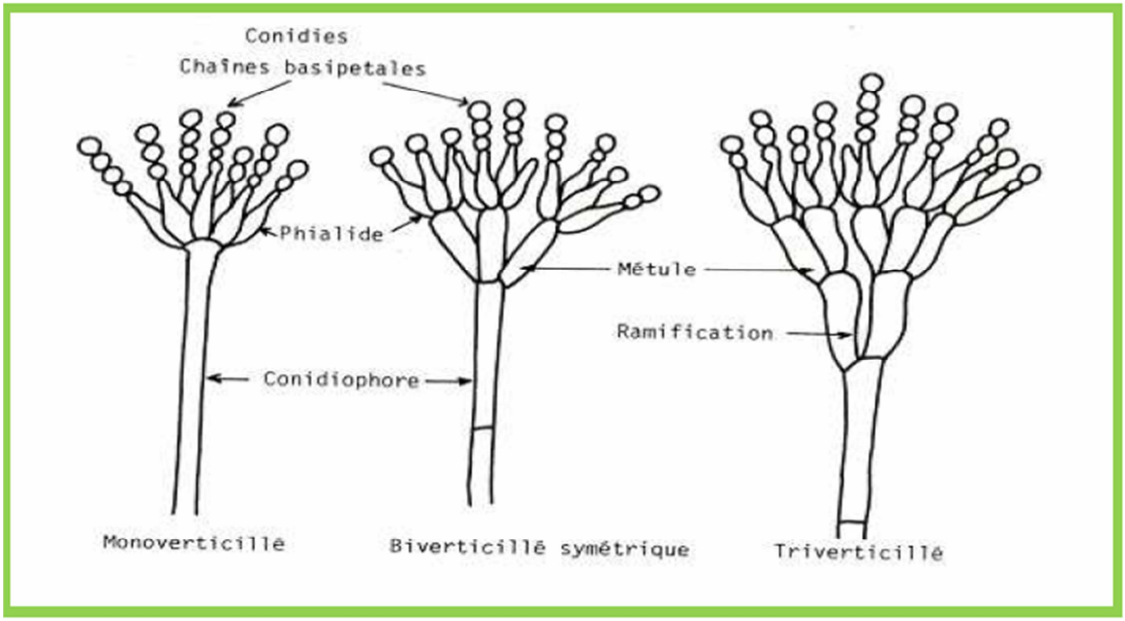


Figure 3. Caractères morphologiques des *Penicillium*.

II.2.2.Le genre *Aspergillus*

C'est un genre appartenant à la classe des *Ascomycètes*. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Figure 4) **(Raper** et **Fennell, 1965).**

Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches **(Botton** *et al*., **1990 ; Roquebert, 1998).** Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines.

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud **(Castegnaro** et **Pfohl-Leszkowicz, 2002),** ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air **(Morin, 1994).**

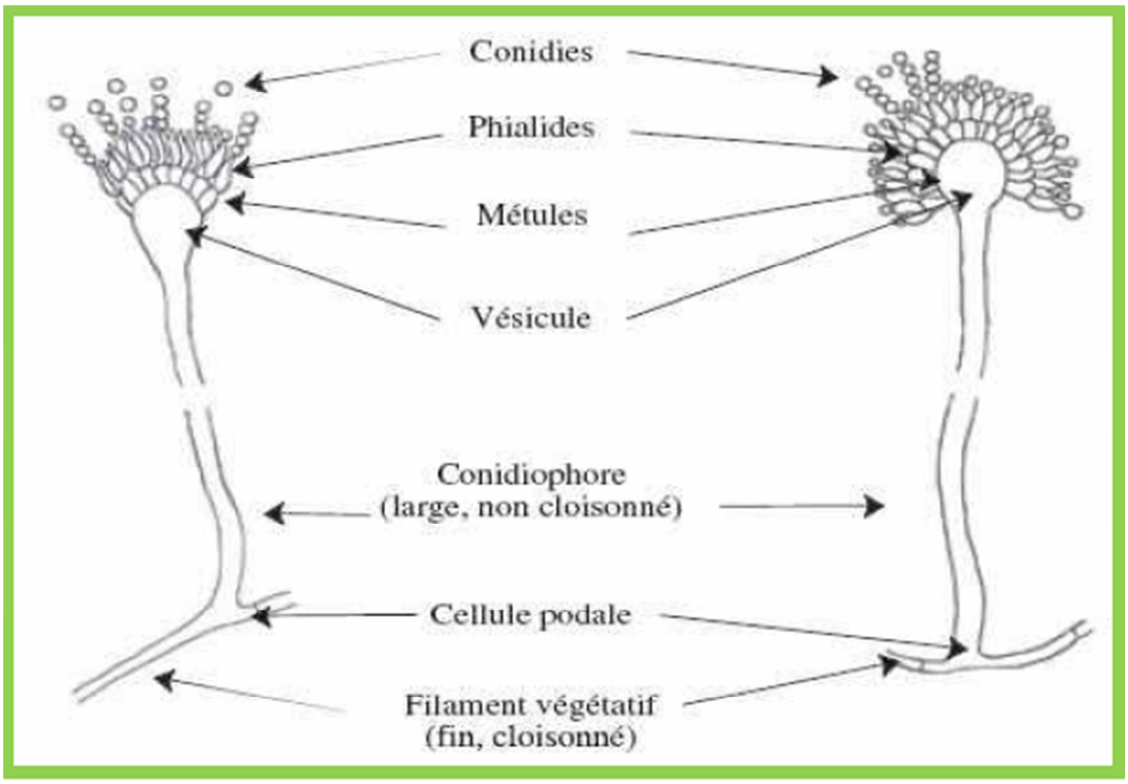


Figure 4. Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus*

II.3.Les bactéries lactiques antifongiques et leur spectre d'action

Les BL recensées dans la littérature comme présentant des propriétés antifongiques appartiennent fréquemment au genre *Lactobacillus* et quelque rares fois aux genres *Lactococcus* et *Pediococcus*. Les spectres d'activité de ces bactéries sont très variés, regroupant des moisissures des genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus* et des espèces de levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* **(Olga, 2011).**

II.4. Les composés antifongiques des bactéries lactiques

Les BL produisent différents composés qui permettent d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes ou d'autres bactéries détériorant les produits alimentaires.

Les premiers composés antifongiques identifiés chez les bactéries lactiques sont des métabolites primaires, souvent des acides organiques, produits au cours de la croissance du microorganisme. Il s'agit de l'acide lactique, acide organique faible qui contribue à la diminution du pH. De même, les BL hétérofermentaires produisent d'autres acides organiques faibles tels que l'acide acétique et l'acide propionique de l'acide formique. En plus des acides organiques produits, les BL sécrètent d'autres composés de faibles poids moléculaire tels que le peroxyde d'hydrogène **(Lindgren** et **Dobrogosz, 1990)** et le dioxyde de carbone **(Ammor** et *al.,* **2006)**. Le peroxyde d'hydrogène est produit en présence d'oxygène comme résultat de l'action des flavoprotéines oxydases ou de la NADH peroxydase **(Ammor** et *al.,* **2006).**

D'autres acides ont été mis en évidence chez *Lactobacillus plantarum*, ce sont l'acide benzoïque, l'acide 3- phenyllactique et l'acide 4-hydroxy-phenyllactic acid **(Niku-Paavola** et *al.,* **1999 ; Lavermicocca** et *al.,* **2000 ; Ström** et *al.,* **2002).** Certains auteurs ont mis en évidence des

protéines antifongiques chez les BL suivantes : *Lactobacillus casei, Lactobacillus casei subsp. pseudoparaplantarum, Lactobacillus paracasei,* etc.

Ces BL produisent également des composés de hauts poids moléculaire tels que les bactériocines ou antibiotiques (la reutérine) **(Luthi-Peng** et *al.,* **2002 ; Galvez** et *al.,* **2007).** Ainsi, ces composés produits ont une action inhibitrice sur certaines bactéries détériorant les produits alimentaires. Ils peuvent être directement appliqués dans les aliments ou les BL sont appliquées directement dans la nourriture comme culture protectrice. Cette découverte a donné un élan pour le développement d'aliment de qualité sanitaire meilleur **(Axelsson 2004 ; Djadouni** et **Kihal., 2012).**

II.4.1. les acides organiques

II.4.1.1. Les acides organiques faibles

Les acides organiques faibles sont fréquemment utilisés comme conservateurs pour réduire le nombre et la prévalence des pathogènes bactériens dans les produits alimentaires. Ces composés inhibent la croissance des cellules bactériennes et fongiques. Parmi ces acides organiques faibles, l'acide lactique (E270) et l'acide acétique (E260) sont les plus acceptés. Il existe également l'acide benzoïque (E210), l'acide propionique (E280) et l'acide sorbique (E200). Ce dernier inhibe aussi la germination et le développement des spores bactériens **(Gould, 2000; Rajkovic et al, 2010).**

Suivant le Parlement Européen et la Directive du Conseil No. 95/2/EC, l'acide lactique est utilisé dans le pain, la bière, la confiture et les huiles non émulsifiées, l'acide acétique est ajouté dans le pain, les aliments de sevrage, les conserves, les fruits et les légumes **(European, 1995).** L'acide propionique et l'acide sorbique peuvent être ajoutés dans les produits de boulangerie pour autant que leur concentration ne dépasse pas 3000 et 2000 ppm, respectivement **(European, 1995).** L'acide benzoïque est utilisé dans différentes sortes de produits alimentaires acides. Toutefois, cet acide faible est généralement associé à la conservation des fruits, à des concentrations n'excédant pas 1500 ppm **(European, 1995; Suhr & Nielsen, 2004).**

II.4.1.2. Le mécanisme d'action

Le mécanisme d'inactivation par les acides organiques repose sur le fait que la forme non dissociée de l'acide organique peut traverser la membrane plasmique et se dissocier dans le cytoplasme de la cellule dans lequel des anions et des protons s'accumuleront sans pouvoir traverser la membrane plasmique. Ce phénomène implique une diminution du pH intracellulaire. Les acides organiques faibles ont donc une activité maximale à pH faible car la forme non dissociée est favorisée **(Gould, 2000; Hazan** et *al.,* **2004).** En effet, les valeurs de pKa de ces acides faibles sont de 3,90 (acide lactique), 4,19 (acide benzoïque) , 4,75 (acide acétique) , 4,76 (acide sorbique) et 4,87 (acide propionique) impliquant que des valeurs de pH supérieures à ces valeurs de pKa réduisent l'activité de ces conservateurs acides **(Gould, 2000 ; Hazan** et *al.,* **2004).** Le rôle inhibiteur des acides faibles tient compte de la rupture de la membrane plasmique **(Brul & Coote, 1999 ; Hazan** et *al.,* **2004),** de l'inhibition des réactions métaboliques essentielles **(Stratford** et *al.,* **2009)**, de l'accumulation d'anions toxiques **(Hazan** et *al.,* **2004)** et du stress sur l'homéostasie du pH intracellulaire **(Brul & Coote, 1999).** Le rôle du pH intracellulaire est

essentiel pour le contrôle de la synthèse d'ATP, d'ARN et des protéines, la réplication de l'ADN, et la croissance cellulaire **(Brul & Coote, 1999).**

Le problème qui se pose lors de l'utilisation de ces acides organiques est la résistance microbienne qui provient de nombreux facteurs. Les bactéries à Gram positives ne possèdent pas de membrane externe, permettant ainsi aux conservateurs de diffuser facilement à travers la membrane plasmique. Leur résistance intrinsèque est relativement faible. La membrane externe des bactéries Gram négatives fournit à la cellule une barrière de perméabilité supplémentaire et donc une résistance plus complexe pour les conservateurs et autres molécules car ils doivent la traverser **(Brul & Coote, 1999).** D'autres études ont également montré que *Saccharomyces cerevisiae* est capable de libérer les anions qui ont été accumulés à l'intérieur de la cellule et ce, grâce à l'existence d'une pompe « multidrug résistance », le transporteur « ATP binding cassette » qui libère ces anions **(Piper** et *al.,* **1998).**

Certains facteurs doivent être pris en compte afin d'optimiser l'activité lorsque les acides organiques sont appliqués comme décontaminant de surface, tels que le type d'acide, la concentration, le pH et la température de la solution acide. De même, il faut également prendre en considération le type de produit (alimentaire), son pH, et la charge initiale en microorganismes **(Wales** et *al.,* **2010).** L'avantage des traitements chimiques est leurs effets antimicrobiens persistant lors du stockage, empêchant une recontamination **(Wales** et *al.,* **2010).**

II.4.2. Le peroxyde d'hydrogène

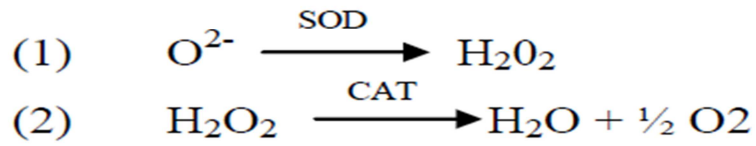
Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est une molécule qui contribue aux dommages oxydatifs. Il s'agit également d'un agent de blanchiment et d'un germicide **(Conner** et *al.,* **2002; Russel & Gould, 2003).** Le peroxyde d'hydrogène a la particularité d'avoir une haute diffusion et un long temps de vie. Il est utilisé dans l'industrie laitière comme conservateur **(Brul & Coote, 1999)** mais est également appliqué sur les fruits **(Sapers** et *al.,* **2001).**

L'addition d'H_2O_2 cause des dommages à l'ADN cellulaire à partir de radicaux hydroxyles hautement réactifs générés par les réactions de type Fenton entre l'H_2O_2 et les ions métaux tels que Fe^{2+} **(Ruiz-Laguna & Pueyo, 1999).**

En effet, lors d'une réduction incomplète de l'oxygène moléculaire ou lors d'expositions à des radiations ionisantes, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont générées telles que le radical superoxyde (O_2•-). Le peroxyde d'hydrogène peut mener en présence du radical superoxyde et des traces d'ions métaux (Fe II), (utilisés comme catalyseurs), à la formation de radicaux hydroxyles (OH•) biocides **(Brul & Coote, 1999; Matilainen & Sillanpaa, 2010).** Ces ROS causent des dommages irréversibles aux composants cellulaires de l'hôte tels que les enzymes, les constituants membranaires et l'ADN **(Juven & Pierson, 1996 ; Brul & Coote, 1999)**. La formation de 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) est une conséquence des multiples dommages oxydatifs induits dans l'ADN par OH•. Ce produit (8-oxoG) contribue aux mutations en induisant des transversions de paires G:C → T:A lors de la réplication de l'ADN **(Moradas-Ferreira** et *al.,* **1996; Ruiz-Laguna & Pueyo, 1999).**

Le peroxyde d'hydrogène est également un composé inhibiteur qui dépend de la concentration appliquée et des facteurs environnementaux tels que le pH et la température. La température est aussi un paramètre important pour l'efficacité sporicide du peroxyde d'hydrogène **(Welk** et *al.*, **2009).**

Néanmoins, les bactéries et les moisissures se protègent du peroxyde d'hydrogène suivant différentes voies. Le système le plus souvent rencontré utilise le glutathion avec des enzymes associées et le système catalase. Les levures ont développé des moyens de défenses principaux qui incluent des antioxydants **(Moradas-Ferreira** et *al.*, **1996 ; Brul & Coote, 1999).** Dans le but de maintenir ces ROS à un niveau physiologique, les levures ont des moyens de défenses antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. La voie enzymatique inclut la synthèse de gènes qui codent pour des superoxydes dismutases (SOD). Celles-ci converties l'oxygène superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Figure 3). Le second moyen de défense (non enzymatique), le glutathion (GSH) agit comme un « nécrophage » des radicaux libres. En effet, son groupe sulfhydryle actif-redox réagit directement avec les oxydants. **(Moradas-Ferreira** et *al.*, **1996 ; Apel & Hirt, 2004).**



Équation 1. Mode enzymatique de détoxification des espèces oxygènes réactives (ROS) par (1) les superoxydes dismutases (SOD) et par (2) la catalase (CAT).

Contrairement aux levures, les bactéries ont développé un système moins important qui comprend l'action de la catalase (CAT) dont le rôle est de dégrader le peroxyde d'hydrogène en eau (Équation 1) **(Brul & Coote, 1999 ; Apel & Hirt, 2004).** Toutefois, le peroxyde d'hydrogène ayant un haut taux de diffusion, et la catalase n'étant pas assez active pour protéger des cellules individuelles, le peroxyde d'hydrogène peut causer des dommages à celles-ci. Les spores de bactéries sont moins sensibles à l'action du peroxyde d'hydrogène car la spore synthétise des protéines acides solubles de type α/β qui protègent l'ADN dans la spore dormante **(Brul & Coote, 1999).**

II.4.3.Le dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone (CO_2) est un gaz non combustible, incolore qui peut être utilisé comme agent antimicrobien dans la nourriture et les boissons **(Shimoda** et *al.*, **2002).** Il est produit par les BL hétérofermentaires. Son action antimicrobienne est dépendante de la pression et de la température mais est également influencée par l'état du CO_2, gazeux ou liquide, et par la concentration dissoute **(Debs-Louka** et *al.*, **1999; Shimoda** et *al.*, **2002).**

L'acidification causée par le CO_2 dissout peut causer une inhibition des microorganismes. En effet, dans la nourriture, dont le contenu en eau est élevé, le CO_2 peut s'y dissoudre et former l'acide carbonique suivant l'Équation 2.

Ainsi, le CO_2 agit en diminuant le pH du milieu et crée un disfonctionnement des systèmes biologiques en altérant les propriétés cellulaires (membranaire, enzymatique et cytoplasmique) **(Debs-Louka** et *al.,* **1999).** L'accumulation de CO_2 dans la bicouche lipidique peut causer un disfonctionnement de la perméabilité et ainsi libérer des substances intracellulaires telles que des composés hydrophobes de la paroi cellulaire et de la membrane cytoplasmique causant ainsi la mort de la cellule **(Debs-Louka** et *al.,* **1999 ; Ammor** et *al.,* **2006;).** Cette accumulation de CO_2 dans les cellules implique également une perte de viabilité, des dommages cellulaires dûs au gonflement avec le CO_2 comprimé et ainsi tue les cellules **(Shimoda** et *al.,* **2002).**

$$H_2O + CO_2 \leftrightarrow H_2CO^3 \leftrightarrow H^+ + HCO^{3-} \leftrightarrow 2H^+ + CO^{32-}$$

Équation 2. Equations d'équilibre de la dissociation du CO_2 dans l'eau pour former de l'acide carbonique

Le dioxyde de carbone joue également un rôle bactéricide en créant un environnement anaérobique et inhibe ainsi les microorganismes aérobies mais aussi les réactions de décarboxylation enzymatiques **(Ammor** et *al.,* **2006).** Le dioxyde de carbone inhibe la croissance de nombreux microorganismes colonisant les produits alimentaires, et plus spécifiquement les bactéries Gram négatives psychrotrophes **(Ammor** et *al.,* **2006).**

II.4.4. La reutérine

La reutérine ou 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) est une petite molécule antimicrobienne dont l'activité est dirigée contre les bactéries Gram positives et Gram négatives, les virus, les levures, les champignons et les protozoaires **(Luthi-Peng** et *al.,* **2002; Martin** et *al.,* **2005; Schaefer** et *al.,* **2010).**

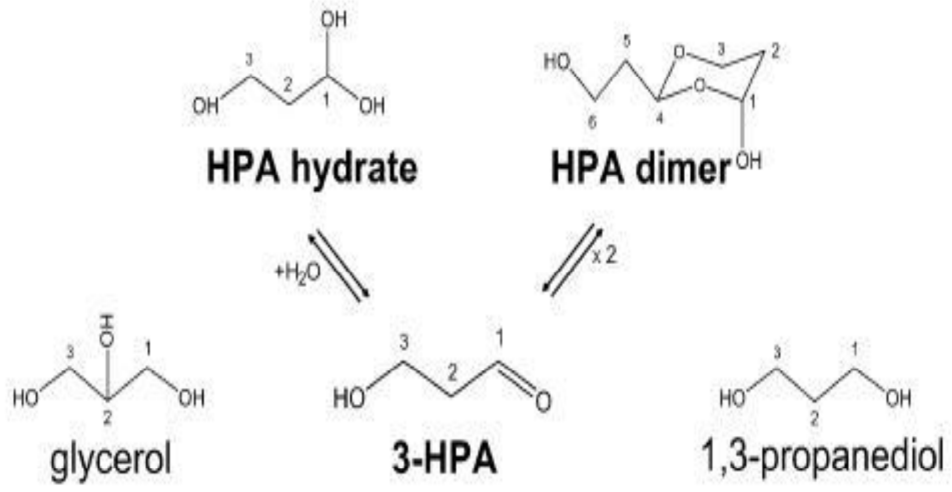


Figure 5. Réactions enzymatiques de la formation du 3-hydroxypropionaldehyde (3HPA) à partir du glycérol. Figure adaptée de **(Vollenweider & Lacroix, 2004).**

La reutérine est formée à partir de glycérol et en solution aqueuse, le 3-HPA subi une dimérisation (HPA dimer) et une hydratation (HPA hydrate) **(Vollenweider & Lacroix, 2004 ; Doleyres** et *al.,* **2005),** deux réactions réversibles comme montré à la Figure 5. La reutérine est active dans une large gamme de pH et résistante aux enzymes protéolytiques et lipolytiques.

La reutérine a été isolée pour la première fois chez *Lactobacillus reuteri*, une bactérie hétérofermentaire présente dans les fermentations de céréales et dans le tractus gastro-intestinal de l'Homme et des animaux. De même, *Lactobacillus reuteri* est utilisé comme bactérie probiotique pour améliorer la santé humaine et plus particulièrement pour lutter contre les désagréments causés par les aliments comme les diarrhées et les coliques **(Ganzle, 2004 ; Cleusix** et *al.,* **2007).** Toutefois, cet antimicrobien a également été trouvé chez *L. brevis*, *L. buchneri* et *L. collinoides* **(Luthi-Peng** et *al.,* **2002).**

La reutérine est produite comme intermédiaire lors du métabolisme anaérobique de conversion du glycérol en 1,3 propanediol (1,3-PDO) (voir Figure 5), une voie proposée pour régénérer du NAD^+ à partir de NADH et qui contribue à améliorer le rendement de croissance **(Ganzle, 2004; Vollenweider & Lacroix, 2004 ; Cleusix** et *al.,* **2007)**. La régulation de cette voie est dépendante de la disponibilité des carbohydrates fermentescibles, en particulier du glucose. La présence de glycérol et sa transformation en 1,3-PDO permet aux cellules de récupérer du NAD^+ utilisé lors de la glycolyse **(Vollenweider & Lacroix, 2004).** La reutérine est métabolisée dans un compartiment spécialisé, le métabolome, à cause de sa toxicité. La voie de conversion du glycérol en 3-HPA est catalysée par un glycérol déshydratase (Figure 5). Cette réaction requiert la présence d'un coenzyme B12 obtenu soit à partir du milieu de culture, soit synthétisé par les microorganismes producteurs de reutérine pour pouvoir synthétiser le glycérol **(Martin** et *al.,* **2005).**

Ce composé antimicrobien est utilisé comme additif alimentaire pour conserver la nourriture de la croissance des microorganismes pathogènes. La reutérine peut être appliquée sur la viande, le lait et le fromage blanc. **(Cleusix** et *al.,* **2007; Schaefer** et *al.,* **2010).**

La reutérine est un analogue du D-ribose capable d'inhiber le substrat liant la sous-unité B1 de l'enzyme réductase ribonucléotide bactérien. Cette enzyme catalyse la première étape de la synthèse de l'ADN, en entrant en compétition avec les ribonucléotides pour les sites de liaison. La reutérine réagit avec les groupements sulfhydriles de la réductase ribonucléotide ou avec la thioredoxine, indispensable à l'activité enzymatique. L'inhibition de la conversion des ribonucléotides en déoxyribonucléotides expliquerait le large spectre d'activité de la reutérine. Un autre mécanisme d'action de la reutérine est dirigé contre les enzymes sulfhydriles **(Cleusix** et *al.,* **2007; Schaefer** et *al.,* **2010).**

II.4.5.Le dipeptides cyclique

Les dipeptides cycliques sont des composés simples et sont pour la plupart, des dérivés de peptides les plus répandus dans la nature. Les dipeptides cycliques sont également connus comme 2,5-dioxopiperazines, 2,5-diketopiperazines, cyclo (dipeptides), ou dipeptides anhydres **(Prasad, 1995).**

Les dipeptides cycliques résultent d'une cyclisation non enzymatique de dipeptides et leurs amines lors de manipulations chimiques ou thermiques **(Kertscher** et *al.,* **1993; Prasad, 1995).** Des études ont montré que ces dipeptides cycliques étaient présents dans les protéines et les hydrolysats de protéines mais également dans les milieux de fermentation, les milieux de culture de levures, lichens et champignons. La prépondérance de ces dipeptides cycliques dans ces milieux serait due au haut niveau de cyclo (His-Pro) présents dans les suppléments nutritionnels dérivés de caséine, une protéine de lait riche en His-Pro, qui après réaction mène à leur cyclisation **(Hilton** et *al.,* **1990; Kertscher** et *al.,* **1993; Prasad, 1995).**

Les dipeptides cycliques peuvent également être synthétisés par les BL et possèdent une activité antifongique. Ceux-ci ont été caractérisés chez *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 et identifiés comme isomères cyclo (L-Phe-L-Pro) et cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) comme montré à la Figure 6.

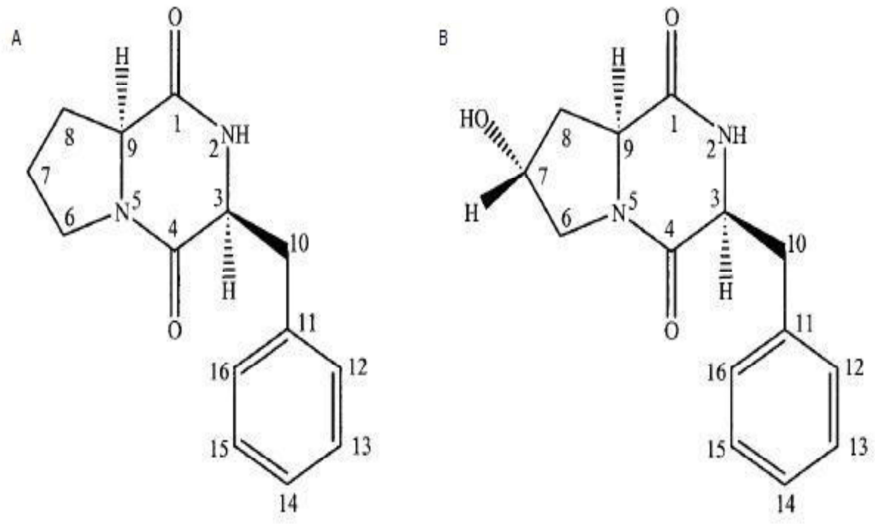


Figure 6. Dipeptides cycliques antifongiques identifiés dans le surnageant de culture de *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 (**Strom** et *al.,* **2002**). **(a)** Cyclo (L-Phe-L-Pro); **(b)** Cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro).

De même, quelques dipeptides cycliques ont déjà été décrits comme étant bioactifs tels que le cyclo (His-Pro), pour lequel, des propriétés antioxydantes ont été mises en évidence. Certains ont également été décrits comme étant antifongiques **(Prasad, 1995; Strom** et *al.,* **2002).**

II.4.6. Les composés protéiques

Des composés antifongiques de nature protéiques ont été isolés à partir du surnageant de culture des BL **(Okkers** et *al.,* **1999 ; Magnusson & Schnurer, 2001; Atanassova** et *al.,* **2003; Coda** et *al.,* **2008)**. Ces composés protéiques ont pour caractéristiques d'être des peptides de faibles poids moléculaire (environ 3 à 4 kDa), sensibles aux enzymes protéolytiques telles que la protéinase K et la trypsine, stables à la chaleur et actifs dans des gammes de pH comprises entre 3 et 6 **(Magnusson & Schnurer, 2001 ; Coda** et *al.,* **2008).** La gamme de pH de la zone d'inhibition de

ces composés protéiques suggère une contribution de l'acide lactique non dissocié pour l'effet inhibiteur **(Magnusson & Schnurer, 2001)**.

Les composés antifongiques de nature protéiques des bactéries lactiques ont essentiellement été isolés de souches du genre *Lactobacillus* **(Atanassova** et *al.,* **2003).** Parmi ceux-ci, *Lactobacillus coryniformis* Si3 **(Magnusson & Schnurer, 2001)**, *Lactobacillus brevis* AM7 **(Coda** et *al.,* **2008)** et *Lactobacillus pentosus* Tv35b **(Okkers** et *al.,* **1999).**

Leur mode d'action antifongique n'a pas encore été décrit mais la pentocine Tv35b produite par *Lactobacillus pentosus* Tv35b est une bactériocine de classe IIa montrant également une activité anti-levure et antifongique qui pourrait agir de la même manière que les bactériocines de classe IIa, par la formation de pores membranaires.

II.4.7. Le diacétyle

Le métabolisme du citrate permet la formation de diacétyle (2,3-butanedione), par l'intermédiaire du pyruvate principalement par des bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus.* Cette molécule est un composé aromatique associé au gout du beurre **(Schnurer** et **Magnusson, 2005 ; Smit** et *al.,* **2005 ; Karimi** et *al.,* **2012).** Son activité antifongique a été démontrée chez *Lb. paralimentarius* PB127 par **Garofalo** et *al.,* **(2012).**

II.5.les facteurs affectant la production des substances antifongiques

Les composés antifongiques produits par les BL ne présentent une activité optimale que sous certaines conditions. Notamment leur activité antifongique dépend de la température et du pH **(Rouse** et *al.,* **2008).** De même leur production dépend du milieu de culture et de la phase de croissance **(Dalié** et *al.,* **2008).**

L'acétate de sodium présent dans le milieu MRS participe au synergie avec les acides organiques produits par les bactéries lactiques et augmente l'effet inhibiteur **(Schnuurer** et **Magnusson., 2005).**

En outre certains genres et certains espèces semblent plus actifs que d'autres, et l'inhibition des levures généralement est difficile par rapport à l'inhibition des moisissures, de même, la germination des conidies est la phase de croissance la plus sensible à l'inhibition et la différence de sensibilité observés entre les espèces des moisissures peuvent être liées à leur capacité à changer le métabolisme cellulaire en réponse à des conditions de stress. la matrice alimentaire ou on souhaite implanter les bactéries lactiques en tant que culture préservatrice et les cibles antifongiques contre lesquelles on désire lutter vont influencer l'activité des souches, car chaque matrice est défini par un ensemble de paramètre physicochimique **(Gerez** et *al.,* **Delavenne** et *al .,* **2013; Gupta** et **Srivastava,2014).**

Matériel et méthodes

II.1. Objectifs de l'étude

La présente étude s'articule autour de l'étude de l'activité antifongique des bactéries lactiques locales associées avec la viande salée séchée artisanale, à l'égard de quelques souches fongique isolées de même produits et essaye de caractérisation des métabolites antifongiques, ainsi, pour répondre aux objectifs de cette étude, nous avons adopté la démarche expérimentale qui comprend les étapes suivantes :

- Préparation de la viande salée séchée dans les conditions du laboratoire.
- Évaluation de quelques paramètres physicochimiques complémentaires au cours de séchage du kaddid.
- Mise en place d'un souchier compose de la flore fongique et d'un autre comprenant la microflore lactique.
- Screening de l'activité antifongique des isolats lactiques et sélection de souches Inhibitrices.

Le travail a été réalisé a partir d'avril 2017 jusqu'à la fin du juin 2017 au niveau des laboratoires pédagogiques de biologie et de la Faculté des Sciences de la nature et de la vie à l'Université de Médéa.

II.2. préparation de la viande

II.2.1. La matrice alimentaire

La matrice alimentaire choisie est la viande d'agneau fraiche, le prélèvement a été fait le 02 avril 2017 auprès d'une boucherie dans la ville de Médéa. La carcasse a été exposé à la vente après environ 24h *post-mortem* et le prélèvement est effectué le matin, l'échantillon est transporté dans une glacière portative au laboratoire et gardé au froid.

II.2.2. Préparation du Kaddid

La viande salée séchée traditionnelle « kaddid » est préparée dans les conditions expérimentales avec deux kilogrammes (2 kg) de la viande gigot d'agneau fraiche, elle est préparée conformément a la méthode traditionnelle de la région saharienne avec des instruments désinfectés et dans les conditions d'hygiène.

La viande est tout d'abord découpée en longues pièces ensuite les pièces sont découpées en lanières fines en suivant les lignes anatomiques de 20 à 30 cm de longueur et de 2 à 3 cm d'épaisseur, les lanières sont frottées avec un mix de 200 g du sel, 2 g poivron noir, 2 g cumin, 10 g sucre cristallisé, ce mix est mélangé avec les lanières d'une façon homogène, ensuite le tout est placé en couches sur une planche métallique désinfectée.

La technique de prélèvement de l'échantillon a été faite suivant la norme **ISO17604 (2003)** à l'aide des instruments stériles et dans les conditions d'hygiène.

II.3. Analyses physicochimique complémentaire

II.3.1. Détermination du pH

La mesure du pH est effectuée selon la technique décrite par **Wang (2000)** et le protocole **AOAC (2007)**. Dix grammes de l'échantillon est homogénéisé avec 90 ml d'eau distillée bouillie et refroidie (1:10 w/v) à l'aide d'un broyeur Stomacher (400 circulator) à une vitesse de 250 rotations/min pendant 3 min. La suspension est laissée en équilibre pendant 5 minutes. Le pH de la viande salée séchée est mesuré avec le pH-mètre à la température du laboratoire, en plongeant l'électrode de ce dernier dans cette suspension suivie par la lecture du chiffre affiche sur l'écran. L'appareil est calibré par des solutions tampons pH4,0 et pH7,0 et le résultat est exprimé par le calcul de la moyenne de trois lectures.

II.3.2. Détermination de l'acidité titrable totale

L'acidité peut être titrée de façon précise à l'aide de la soude, un échantillon précis de 10ml .La valeur en acidité titrable totale a été déterminée selon le protocole décrit par **Sadler et Murphy (2010)**, dans un bécher on introduit 10 ml de la suspension de la viande salée séchée et on ajoute quelques gouttes de l'indicateur phénolphtaléine ensuite on titre par la solution de soude 0,1 N en agitant doucement le contenu de bécher jusqu'a l'obtention d'un virage de la couleur au rose pâle qui persiste quelques secondes et qui correspond au pH 8,2 du point de virage de phénolphtaléine. L'acidité titrable totale (ATT) de l'échantillon a été exprimée en pourcentage de l'acide lactique dans la base de la matière sèche.

II.3.3. Détermination de l'humidité

La teneur en humidité est déterminée selon la méthode officielle **AOAC (1998)**. 5g de l'échantillon bien broyé est pesé dans un creuset taré et séché puis introduit dans une étuve pendant 18h à la température de 102 °C. Le poids de l'échantillon est déterminé après dessiccation complète.

La teneur en humidité est calculée par la différence entre le poids initial (Pi) de l'échantillon et le poids final (Pf) après séchage, la moyenne de deux mesures est calculée et l'humidité est exprimée en pourcent (%) (Poids/Poids).

$$\mathbf{H\ (\%) =.((P_i - P_t) - (P_f - P_t))/ (P_i - P_t) \times 100}$$

La teneur en eau (TE) de l'échantillon est exprimée en pourcent (%) de la matière sèche (MS) selon la relation suivante :

$$\mathbf{TE\ (\%\ MS) = ((Pi\text{-}Pf)/Pf)\ x100}.$$

La matière sèche (MS) des échantillons a été obtenue selon la formule suivante

$$\mathbf{MS\ (\%)= 100\ -TE\ (\%)}.$$

Où :

P_i : poids de l'échantillon et le creuset avant séchage (g).

P_t: poids de la tare.

P_f : poids de l'échantillon et le creuset après séchage (g).

II.3.4. Calcul de l'activité d'eau (a_w)

L'a_w de l'échantillon du kaddid est calculé à l'aide d'une équation mettant en relation la teneur en eau et l'activité en eau; équation donnée par **Kouete Kongni (2012)**, et elle est obtenue d'après les travaux de **Ruiz-Ramirez et *al.* (2005)**.

$$a_w = (8{,}139 Ln (TE) + 51{,}14)/100.$$

Où :

a_w : represente l'activite en eau.

TE : teneur en eau.

II.4. Mise en place d'une collection de la flore lactique

II.4.1. Préparation de la solution mère et des dilutions

Une quantité homogène de l'échantillon est broyée aseptiquement dans un mortier préalablement stérilisé. 10 g du broyat de l'échantillon est transféré dans un sachet stérile type Stomacher. Cette quantité a reçu 90ml du bouillon tryptone- sel- eau (TSE), le tout est homogénéisé dans le Stomacher à une vitesse de 230 rotations/min pendant 3 min (**NF V 08-010 Mars 1996**).

La suspension est laissée à température ambiante pendant 15 minutes pour la revivification des germes, la solution obtenue est considérée comme solution mère. À partir de la solution mère (10^{-1}), les dilutions sont poussées jusqu'a 10^{-2}.

Le dénombrement des différentes flores est effectué à l'aide d'un compteur de colonies, on tenant compte que les boites contiennent entre 30 et 300 colonies. Le nombre par gramme de kaddid est calculé à l'aide de la formule suivante **(ISO 7667 juin 1984 V 08-001)** :

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1 n_2) d}$$

Où :

$\sum c$: La somme des colonies comptées sur toutes les boites retenues ;

n_1 : le nombre de boites retenues pour la première dilution ;

n_2 : le nombre de boites retenues à la seconde dilution ;

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

Si les deux boites contiennent moins de 15 colonies, on a fait la moyenne arithmétique *y* des colonies comptées sur deux boites, et les résultats sont exprimées en microorganisme par gramme comme suit :

$$N_E = y/d$$

Ou : *d* le taux de dilution de la suspension mère.

Ou : *y* la sommes des colonies comptées sur toutes les boites retenues.

II.5. Mise en place d'une collection de la flore lactique

II.5.1. Isolement et purification

L'isolement des bactéries lactiques est réalisé par étalement d'un ôse de culture des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} en double sur gélose MRS de base. L'incubation est faite à 27 °C pour pendant 3 à 5 jours. La purification est réalisée sur les géloses et les bouillons MRS (**Idoui et *al*., 2009**).

II.5.2. Caractérisation et identification préliminaire des isolats

II.5.2.1. Examens microscopiques

Les observations microscopiques sont effectuées, à l'aide d'un microscope optique avec un objectif 100 à immersion, permettent d'examiner des prélèvements de colonies à l'état frais et après coloration de Gram (Annexe II), celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement (**Idoui et *al*., 2009**).

II.5.2.2. Recherche de la catalase

Cette enzyme est mise en évidence par la mise en contact de la culture à étudier avec une goutte d'eau oxygénée (10 %) sur une lame. La présence de l'enzyme se manifeste par l'apparition de bulles gazeuses (d'oxygène) (**Idoui et *al*., 2009**).

II.5.2.3. Identification physiologique des isolats lactiques

Après purification, coloration de Gram et test de catalase, vingt-neuf (29) isolats sont retenus, dont nous avons identifié les genres conformément au protocole de **Carr et *al*. (2002)** (Figure 7), et usage du tableau (1) des caractères différentiels de **Von Wright** et **Axelsson (2012)**.

- ✓ **Croissance à différentes températures**

Ce test est important, car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles. Après inoculation du bouillon MRS par les cultures pures, les tubes sont incubés aux températures 10 °C pendant sept à dix jours et à 45 °C pendants 24 heures, au bout de ces délais, la croissance est appréciée par examen des milieux. Les bactéries mésophiles poussent à 10 °C alors que les bactéries thermophiles ne le font pas.

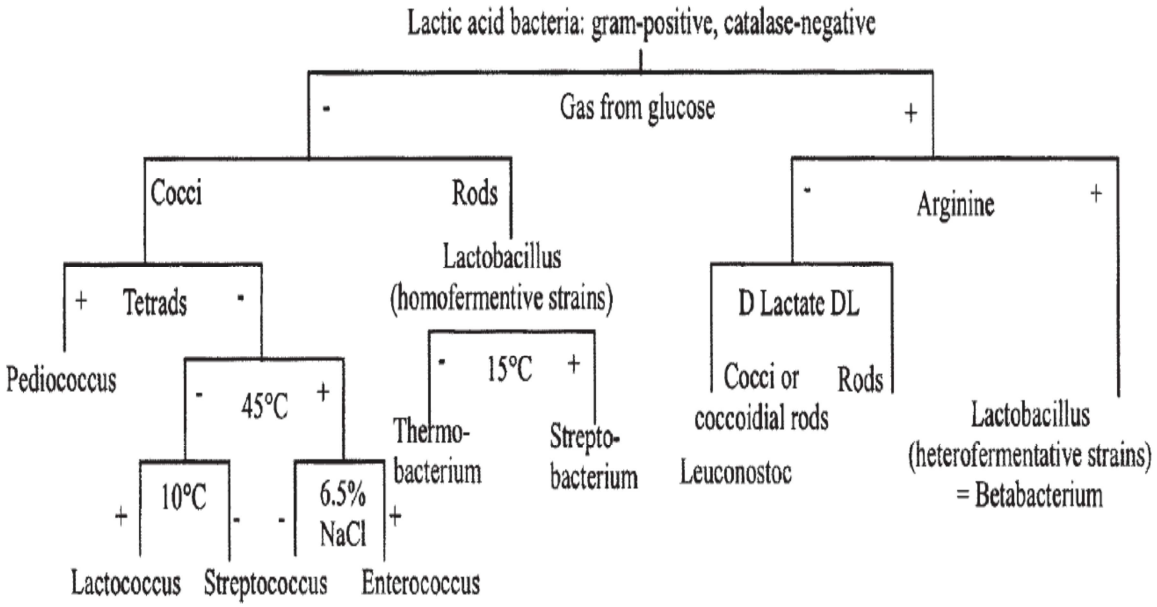


Figure 7. Schéma de différenciation des genres des bactéries lactiques (**Carr et *al*., 2002**).

- ✓ **Croissance dans des conditions hostiles**

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) et différents pH donne des renseignements précieux pour l'identification. Les pré-cultures à tester sont ensemencées sur des bouillons MRS hypersalés à 4 % et à 6,5 % de NaCl, et à des pH 4 et 9,6. Après une incubation à la température optimale pendant 24 h, l'aptitude à croître sur ces milieux se traduit par l'apparition d'un trouble.

- ✓ **Recherche de type fermentaire**

Ce test permet de différencier les bactéries lactiques homofermentaires de celles hétérofermentaires. Il consiste à mettre en évidence la production de gaz (CO_2) à partir du glucose. Pour se faire, le milieu Gibson-Abdelmalek est ensemencé par les pré-cultures bactériennes par piqûre centrale, puis un bouchon de la gélose blanche stérile est coulé en surface. Après incubation, les isolats hétérofermentaires producteurs de gaz poussent le bouchon de la gélose en haut.

II.5.2.4. Conservation des souches

Les isolats considérés comme étant des bactéries lactiques sont conservés à -20 °C en double exemplaire en utilisant le bouillon adéquat d'une culture jeune (18 heures) à 30 % (v/v) du glycérol stérile.

II.6. L'analyse mycologique

II.6.1. Dénombrement de la flore fongique

La méthode utilisée pour le dénombrement de la flore fongique est « la méthode de dilution ». Cette méthode, selon **Cahagnier (1988)**, nous permet le comptage de la flore externe et interne à partir de la même suspension mère.

II.6.2. La méthode de dilution

L'intérêt de cette méthode réside dans le fait que les propagules fongiques sont dénombrées à partir de la même suspension mère, et qu'elles intègrent la flore interne et externe **(Cahagnier, 1998).**

Un milieu est couramment utilisé pour le dénombrement de ces propagules fongiques :

- **PDAa** (Potatoes Dextrose Agar acidifiée) ; ce milieu a été utilisé, pour l'isolement des moisissures à partir de l'échantillon **(Djaaboub, 2010).**

A partir de chaque dilution on ensemence deux boites de pétri stériles avec 1 ml d'inoculum étalé en surface, l'incubation se fait à 25 ± 2°C pendant 5 à 7 jours.

NB :

- Afin d'éviter la contamination bactérienne, le milieu **PDA** est acidifié jusqu'à un pH de 4,5 à 5 en ajoutant 1 ml d'acide lactique à 25% par flacon de milieu.
- Le milieu est supplémenté avec 4 % NaCl dans le milieu **PDAa** par le temps (J_0, J_3, J_7, J_{15}) au cours de séchage et la maturation de la viande salée séchée **(Tabuc et *al.*, 2004).**

II.6.3. Purification et conservation

En vue de l'obtention des isolats purs, plusieurs repiquages successifs sur milieu PDAa ont été réalisés. Les isolats sont repris sur des tubes de PDAa inclinés et incubés à 25 ± 2°C pendant une semaine ou plus. Afin d'assurer leur conservation, les tubes sont conservé à 4°C **(Botton et *al.*, 1990).**

II.6.4. Identification des moisissures

L'identification des moisissures fait essentiellement aux caractères culturaux et morphologiques**.**

- **Caractères macroscopiques :** ce sont les critères culturaux comme : la vitesse de croissance, la texture et couleur du thalle, la couleur du revers de la culture, l'odeur exsudat et la présence d'un pigment diffusible.
- **Caractères microscopiques :** c'est l'étude microscopique du mycélium, la nature des organes différenciés et l'étude biométrique.

II.6.5. L'identification des genres : Technique de micro culture

Cette technique décrite par **(Haris, 1989)**, repose sur l'emplacement des petites carrés de PDAa sur des lame stériles, et les recouvrir par des lamelles, les spores sont ensemencées sur les limites périphériques des carrés, l'ensemble est incubé dans des conditions stérile et humide à 25°C pendant 3 à 5 jour. La **photo 1** montre le principe de la microculture.

Après incubation, les lamelles sont déposées sur des nouvelles lames stériles contenant quelques gouttes de lactophénol pour faciliter l'observation microscopique. L'observation microscopique se fait aux grossissements ×10, ×40 et ×100. Les genres sont déterminés par les caractères culturaux et microscopiques.

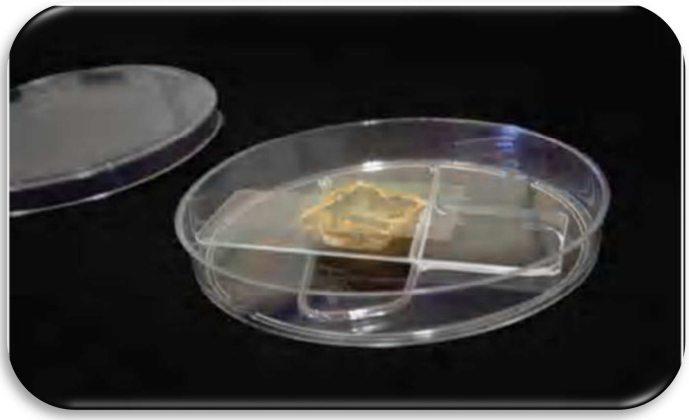


Photo 1. Technique de Micro culture pour l'identification microscopique des moisissures.

II.7. Mise en évidence du pouvoir antifongique (test qualitatif)

Pour la recherche de l'activité antifongique, la méthode en double couches ou de recouvrement décrite par **Magnusson et *al.* (2003**) a été utilisée avec des modifications mineures :

Les isolats sont d'abord ensemencés en deux stries de 2 cm sur 15 ml de milieu MRS Agar préalablement coulés dans des boîtes de Pétri puis incubés à la température optimale en anaérobiose à 27 °C pendant 48 heures. Les colonies obtenues sont ensuite recouvertes avec 10 ml de milieu PDA (0,8 % d'agar) ensemencés par la méthode de single spore à partir de la suspension sporale (0,2 % d'agar) des isolats fongiques. Après 72 heures d'incubation à 25 °C, les zones d'inhibition sont mesurées autour de chaque strie de bactérie et évaluées selon les critères suivants :

(-) : absence de zone d'inhibition autour de chaque strie ;
(+) : zone d'inhibition par strie comprise entre 0,1 à 3 % de la surface des boîtes de Pétri.
(++) : Zone d'inhibition par strie comprise entre 3 à 8 % de la surface des boîtes de Pétri.
(+++) : Zone d'inhibition par strie supérieure à 8 % de la surface des boîtes de Pétri.

II.7.1. Détermination de la nature de l'agent inhibiteur

Le protocole décrit par **Yaakoubi et *al.* (2009)** permet de mettre en évidence la nature de l'agent inhibiteur, il se base sur un arbre décisionnel présenté par la figure 8.

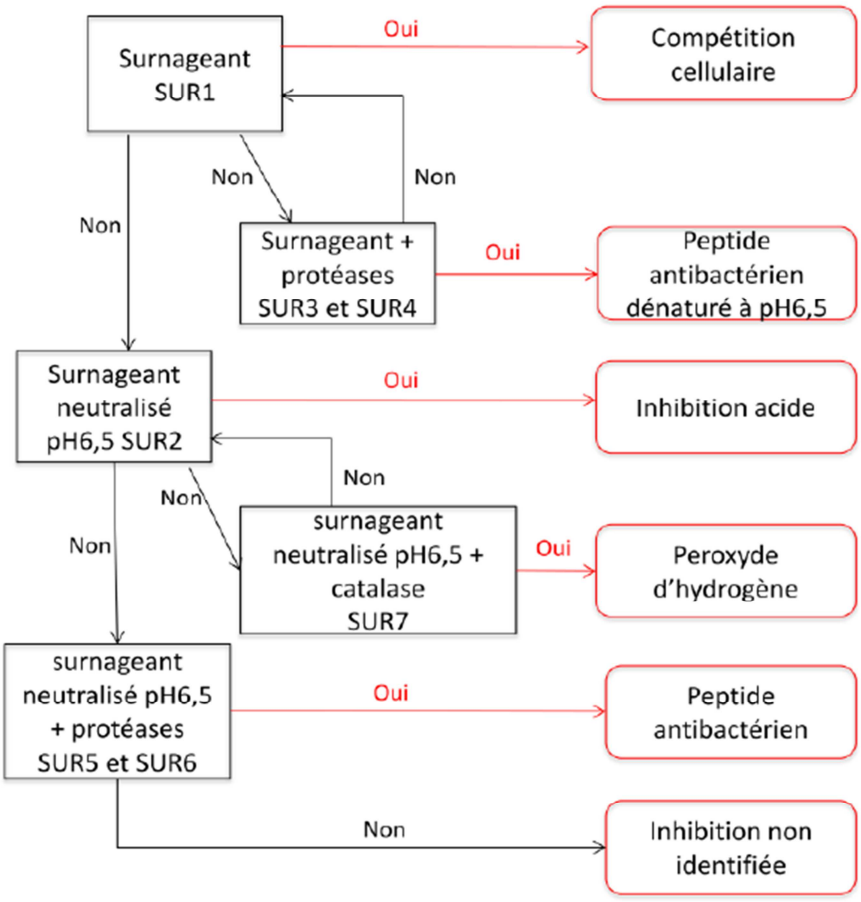


Figure 8. Arbre décisionnel des modalités d'identification des produits responsables de l'inhibition portant sur la question de la croissance des souches indicatrices (« oui » traduisant une croissance des souches indicatrices et « non » une absence de croissance) (**Duniere, 2012**).

II.7.1.1. Inhibition due à la production des acides organiques

L'étude de l'effet de l'abaissement du pH du milieu sur l'inhibition des souches fongiques est réalisée en milieu MRS tamponné à pH 6,5 par une solution 5N NaOH, puis le surnageant neutralisé est filtré à travers des membranes millipores 0,22 µm (**Castro et *al*., 2011**). La technique (diffusion au milieu solide) : les souches fongiques sont activées dans 9 ml de l'eau physiologique par la méthode de single spore puis sont ensemencés par étalement à partir de la suspension sporale sur 15ml de milieu PDA de base, à la surface de milieu dans un puits on ajoute 75 µl de surnagent à étudier.

II.7.1.2. Inhibition due au peroxyde d'hydrogène

Les souches performantes sont activées dans 10 ml de bouillon MRS pendant 18h. Des flacons de 100 ml de bouillon MRS stérile sont ensemencés à raison de 1 % (v/v) pour chaque préculture. Les flacons sont incubés en anaérobiose à 27 °C pendant 48 h. Les cultures sont centrifugées à 5000 tours/15 min à 4 °C. Une fois les surnageants sont prêts, pour chaque surnageant un volume est neutralisé à pH 6,5 puis traité par la catalase (1mg/ml dans un tampon phosphate salin pH 7,2), puis incubée à 25 °C pendant 2 h (**Herrerosa et *al*., 2005**). Le reste du volume de chaque surnageant est réparti selon les différents traitements.

La même technique décrite (diffusion au milieu solide), a été appliquée en utilisant les surnageants avec les différents traitements comme suit :

- Puits 1 : 75 µl du surnageant natif.
- Puits 2 : 75 µl du surnageant natif + NaOH (5N) + filtration (pour mettre en évidence l'effet du H_2O_2 et d'autres agents antimicrobiens présents).
- Puits 3 : 75 µl du surnageant natif + catalase (1mg/ml du tampon PBS pH 7,2) + filtration pour éliminer l'effet du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 présent dans le surnageant.
- Puits 4 : 75 µl du surnageant natif + NaOH + Catalase + filtration (pour éliminer l'effet du H_2O_2, les acides organiques et confirmer la présence d'autres substances antimicrobienne).

Après incubation 3jours à 25 °C, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.

Résultats et discussion

III.1. L'analyses physicochimiques

III.1.1. pH

La mesure du pH traduit l'acidité ou l'alcalinitéd'un milieu, c'est un paramètre aussi qui détermine la croissance des moisissures et les bactéries lactiques **(Delachareirei, 2008).**

Les résultats du pH de la viande au cour de maturation illustrés dans la **Figure 9** indiquent que la viande est moyennement acide avec des valeurs comprises entre [5.15- 5.65] au cours de maturation, Après 7 jours de séchage, il chute à 5, 18, lekaddid le plus sec au J_{15} a enregistré la valeur maximale du pH tandis que la viande fraiche a signalé la valeur minimale de cette intervalle.

Ces résultats sont inférieurs par apport à ceux trouvé par **Daabouz**et*al.***(2008)**,qui ont montré unpH de 6.1 pour l'échantillon de la viande fraiche de dromadaire et de 6.4 pour celui de bœuf. Par ailleurs, les résultats de l'étude menée par **Zaier**et*al.* **(2011)** sur des échantillons de kaddid préparés expérimentalement avec les différentes modalités de séchage et salage ont montré que le pH était compris entre pH 5,52 et pH5,55.

Nos valeurs du pH sont légèrement supérieures à celles obtenues par **Bennani**et*al.* **(1995)** qui ont indiqué que le pH de kaddid traditionnel Marocain était compris entre 5.2 et 5.4. Cependant, **Bennani**et*al.* **(2000)** ont trouvé une valeur du pH 5.1 après 18 jours de la maturation de kaddid fabriqué par la méthode traditionnelle.D'autrespart, les résultats de **Petit** et *al.* **(2014)** qui ont travaillé sur les différents types de viandes salées séchées traditionnelles « biltong » en Afrique de Sud, ont montré que dans le groupe des produits secs le pH était compris entre pH5,00 pH5,55.

L'augmentation du pH peut être attribuée à la protéolyse. D'après **Ruiz-Moyano et** *al.* **(2011),** ellepeut être due à l'activité protéolytique générée par les microorganismes. Les protéases bactériennes provoquent la dégradation protéolytique, génèrent des peptides, des acides aminés et des amines qui ont un effet tampon sur les acides organiques produit par les bactéries lactiques durant la fermentation. En expliquant l'abaissement de pH final durant la maturation de la viande peut être liée à l'activité protéolytique générée par les microorganismes.

Selon**Tabuc (2007),** le pH du milieu est un facteur important de croissance des moisissures. Les moisissures sont capables de se développer normalement à des pH compris entre 3 et 8. D'après ces résultats obtenus, on peut déduire que nos échantillons sont des substrats exposés à une contamination fongique.

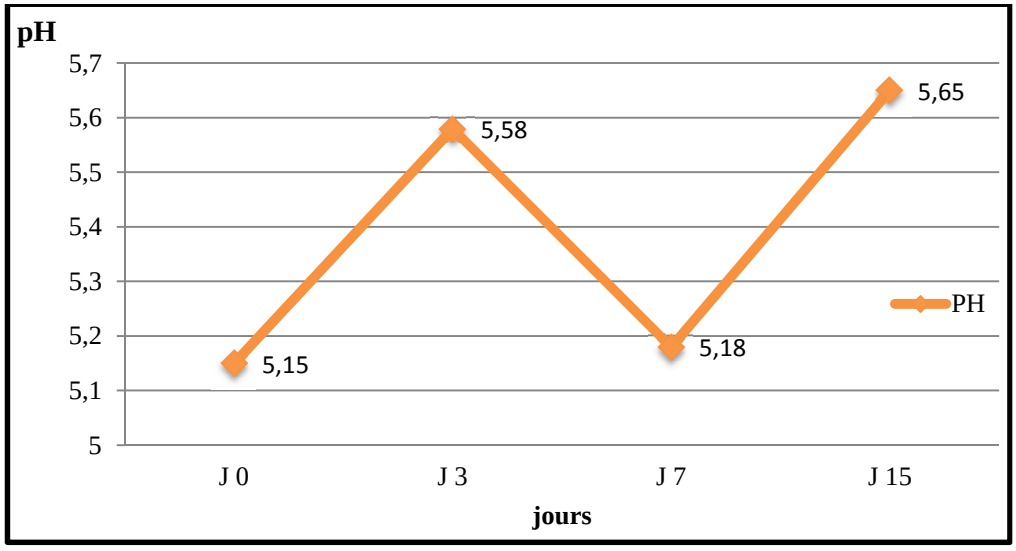


Figure 9. Résultats de l'évaluation du pH au cours de séchage du kaddid.

Les différences des valeurs de pH de la viande par rapport aux autres produits peuvent être dues à la méthode de préparation, au type de viande, à la date de préparation ou peuvent être liées au type d'alimentation donnée aux animaux (**Ouadghiri., 2009)**.

III.1.2.Acidité titrable totale(ATT)

Les résultats de l'acidité titrable totale (ATT) de nos échantillons sont représentés dans la Figure suivante. Laviande au cours de séchage présenteune acidité de 0.4% et 2.2% respectivement pour la viande fraiche et celle de $J_{15,}$ Nos résultats relatifs à la l'acidité titrable totale sont légèrement inférieurs à celle trouvée par **Boubakri (2015).**

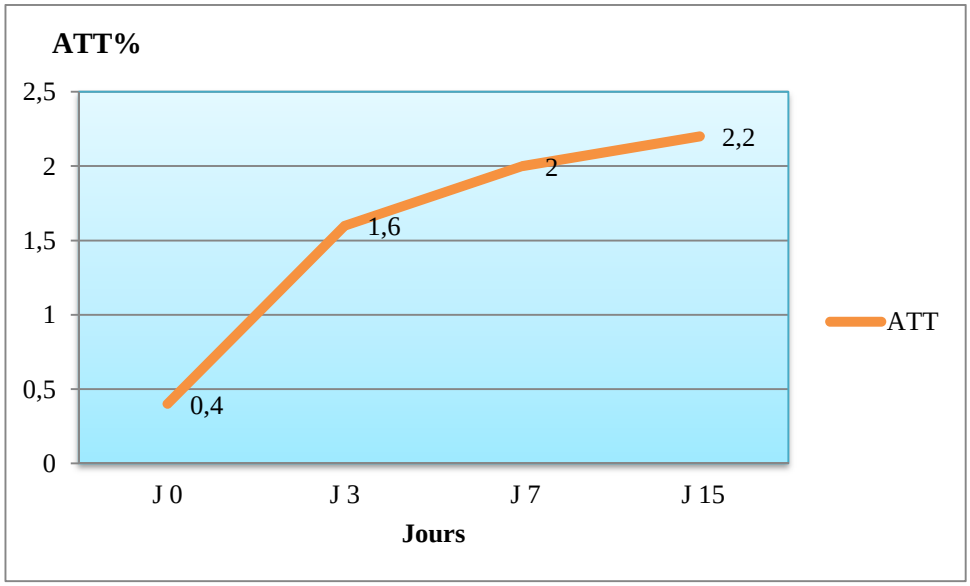


Figure 10. Résultats de l'évaluation d'ATT au cours de séchage de kaddid

L'augmentation de l'acidité titrable totale dans le kaddidpeut être liée à la production des acides organiques par les bactéries lactiques autochtones, notamment par les bactéries lactiques hétérofermentaires particulièrement les *Leuconostoc*comme observé par **Essid et Hassouna (2013)**.

III.1.3. L'humidité, la teneur en eau et la matière sèche

L'humidité est un paramètre de très grande importance, c'est un indice crucial pour l'estimation de la qualité d'un produit (**Michel**et**Wattiaux, 2000).** Ellejoue un rôle primordial sur le développement des populations fongiqueset lactiques **(Tabuc, 2007).**

Les valeurs de l'humidité s'échelonnent entre 1.5 % après 15 jours de séchage et à 58 % pour la viande fraiche. La figure 14 nous permet de constater qu'en général les viandes sèches (kaddid) analysées présentent un taux d'humidité moins élevé que la viande fraiche**.** Selon les données rapportées par **Boubakri (2015)**, nos résultats d'humidité sont supérieurs.

Ce paramètre est l'un des principaux facteurs physiques qui influencent la croissance des moisissures et des microorganismes **(Mitchell**et*al*, **2004).** Généralement, les moisissures se développent aux champs, comme celles se développent sur le matériel de putréfaction nécessitent une forte humidité **(20 à 25 %)** pour leur croissance, alors que les moisissures de stockage sont capables de se croître sur des substrats contenant seulement **10 à 18 %**d'humidité **(Tabuc, 2007)**.

Par ailleurs les différents temps (J_0, J_3, J_7, J_{15}) de séchage la viande présenteune diminution de la teneur en eau où on a signalé une valeur de 65%dans la viande fraîche et de 2% dans le kaddidà J_{15}.Ces valeurs obtenues sont inférieures à celles trouvées par **BENNANI et *al.* (1995)** qui ont déterminé une teneur en eau moyenne de kaddid traditionnelle de 10.38 %.

Les résultats de la matière sèche illustrés dans la **Figure 11** signalent qu'il y a une augmentation au cour de la maturation, Ces valeurs varient de (35% à 98%) les limites ont été signalées respectivement pour la viande fraiche et celle séchée au J_{15}.
Le taux de matière sèche obtenu par **Daabouz et *al.* (2008)** est 39.1% pour le dromadaire frais et 44.1% pour le bœuf frais. Ces résultats nous ont permis de déduire que notre viande fermentée a signalé des valeurs supérieures à celles de **Daabouz et***al.***(2008)**. Par ailleurs nos résultats des matières sèche dans le kaddid (98%) sont supérieurs à ceux trouvés par **(KoueteKongni, 2012).**

La teneur en eau obtenue de la viande séchée est légèrement faible par rapport à celle de viande fraîche. On remarque qu'il y a une diminution considérable de l'humidité dans le Kaddid, par ailleurs une augmentation de la matière sèche ce résultat explique que la préparation du Kaddid provoque l'évaporation de l'eau à partir de la matière première (viande fraiche), ces résultats révèlent une relation inversement proportionnelleavec la contamination par la flore fongique.et une relation proportionnelle avec la croissance des bactéries lactiques.

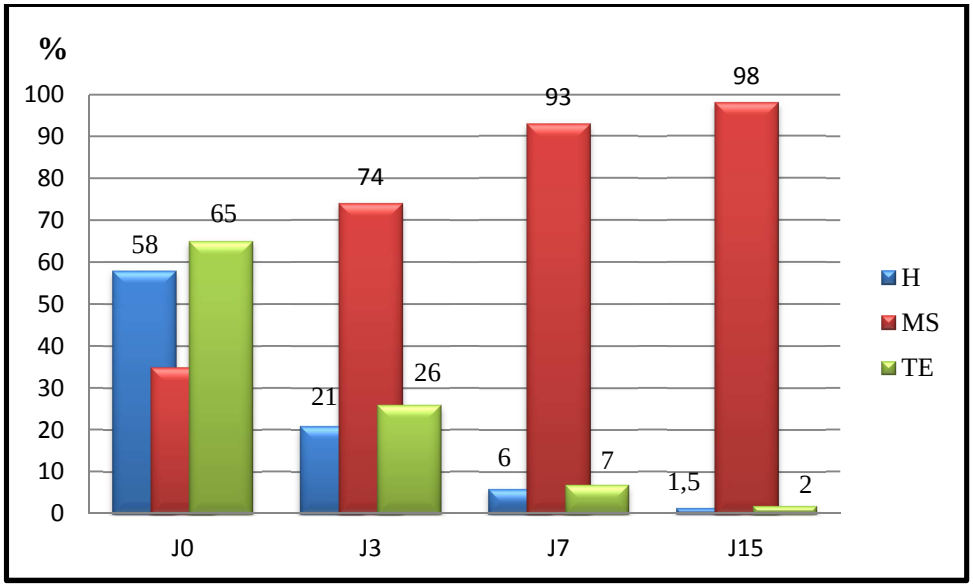


Figure 11. Résultats de l'évaluation de l'humidité, teneur en eau et matière séche au cours de la maturation du kaddid.

III.1.3. l'activité d'eau (a_w)

Les résultats de l'$a_w$représentés sur la**figure 12** enregistrent une valeur de 0.85 pour la viande fraiche et un $a_w$de 0.17 pour le kaddid au J_{15}. Nos résultats de l'a_w sont inférieurs à ceux trouvés par **Thomapetit**et*al.* **(2014)** pourles viandes fraîchesoù ils ont trouvé des valeurs de 0.65. Par contre nos résultats de kaddid sont inférieurs à ceux de **Thomapetit**et*al* **(2014).**Le phénomène du déclin rapide de l'activité d'eau eau au cours de séchage est probablement dû à la perte d'eau libre durant le processus du salage/séchage, suivi d'un séchage lent lié à la déshydratation osmotique sous l'effet des concentrations élevées en sel. Des observations similaires ont été rapportées par **Bennani et** *al***. (2000)** ; **Ruiz-ramirez et** *al***. (2005)** ; **Zaier et** *al***. (2011)** ; **Hajji et** *al***. (2011)** et **Chabbouhet***al***. (2012**). L'activité de l'eau est le facteur le plus important à maitriser durant le processus de déshydratation. elle doit être diminuée rapidement et le plus vite possible pour stopper ou retarder les microorganismes de dégradation du produit (**Bennani et** *al***., 2000**).

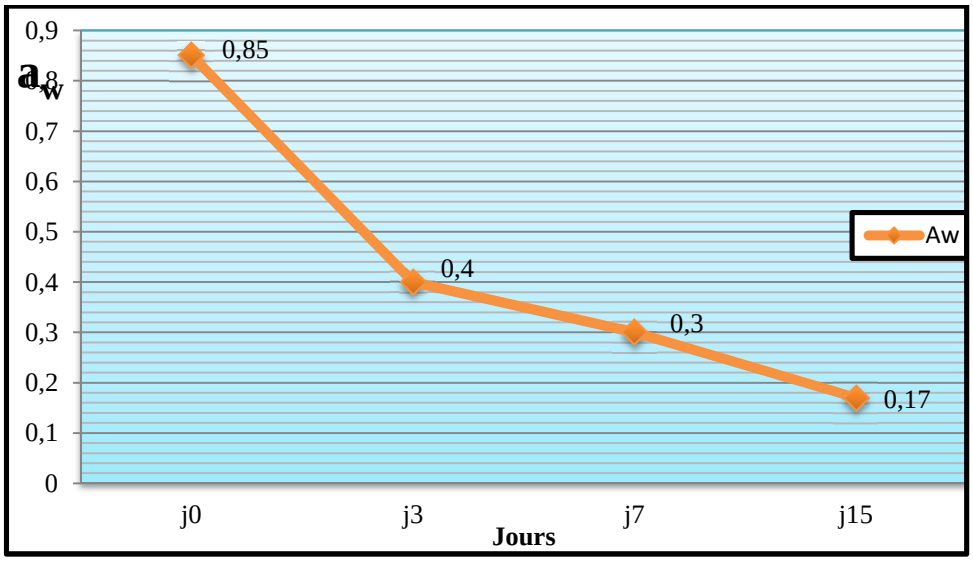


Figure 12. Résultats de l'évaluation d'a_w au cours de séchage et maturation du kaddid.

III.2. Analyse mycologique

L'analyse mycologique nécessite la détection précise, qualitative et quantitative de la microflore contaminant nos échantillons.

III.2.1. Dénombrement et isolement des moisissures

L'échantillon du kaddid a fait l'objet d'une évaluation de sa qualité mycologique par dénombrement et recherche de la flore fongique, Les résultats consignés dans le tableau 1 (voir l'annexe III).

III.2.1.1. Dénombrement de la flore fongique

III.2.1.1.1. Méthode directe (méthode de dilutions)

Les résultats obtenus par cette méthode montrent une diversité importante des moisissures dans tous les temps de prélèvements.Notons une préférence des champignons pour le milieu PDA.

Le PDAa (PDA acidifié) est un milieu organiqueà $a_w$élevé, il donne une vitesse de croissance variant en fonction de l'a_w à une température de (25°C). Ce milieu a été utilisé pour la croissance des moisissures isolées à partir des différents échantillons.

Les résultats affichés sur la figure 16 indiquent un taux de contamination élevé en fonction de temps de (19.318.10 UFC/g) dans le milieu PDA au $J_{15,}$ et une absence totale de la croissance fongique dans le J_{15} sur le milieu OGA, et un taux de contamination minimal sur le même milieu a été soulevé au J_7 (10.10UFC/g), ainsi que les résultats de la contamination fongique sur le milieu OGA a été supérieur au J0 par rapport au milieu PDA.

La comparaison effectuée entre les flores fongique révélées sur les deux milieux de culture PDAa, OGA permet de constater que la flore fongique de la variété locale dénombrée sur le milieu PDA est plus élevée que celle dénombrée sur milieu OGA.

la viande au cours de sa maturation au J_0 et au J_3ont présenté des taux de contamination plus élevés, Cette variation peut être due à la différence des conditions physico-chimiques (Humidité, teneur en eau, pH…) permettant la germination des spores dans ces échantillons. Ce qui peut entraîner une modification qualitative et quantitative de la microflore. **(Lebars**et*al,* **1987).**

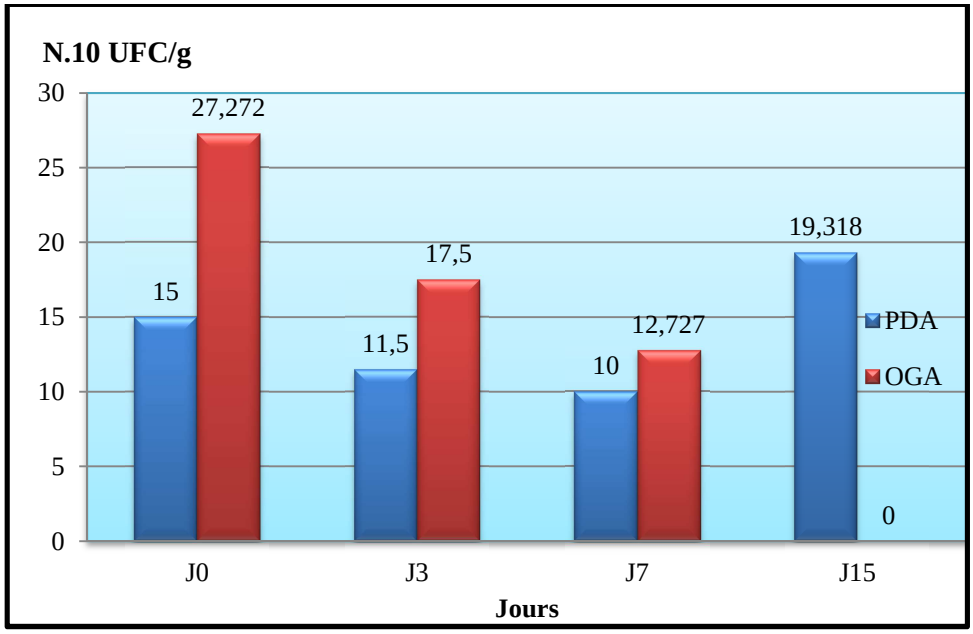


Figure 13. Résultats de l'évaluation de la flore fongique au cours de séchage du kaddid.

L'obtention des isolats purs repose sur la réalisation de plusieurs repiquages successifs sur milieu PDAa, Pour les moisissures et le GN pour les levures. Ces isolats purs sont repris sur des tubes de PDAa inclinés puis incubés à 25 ± 2°C pendant 5 à 7 jours. La conservation des tubes a été faite à 4°C.

III.2.2. Caractérisation de quelques souches fongiques sélectionnées

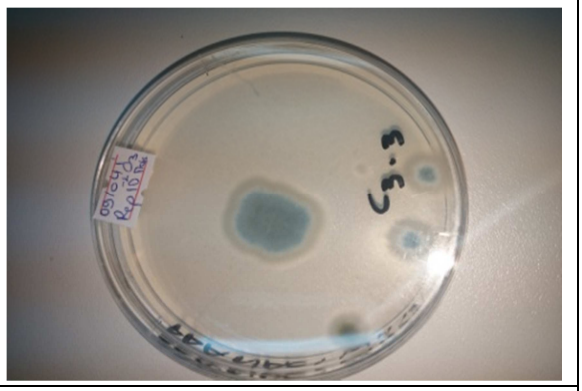
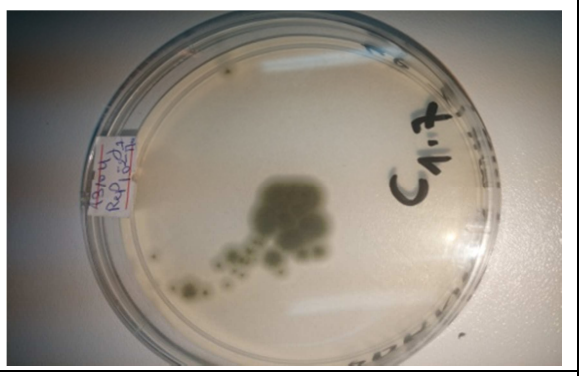
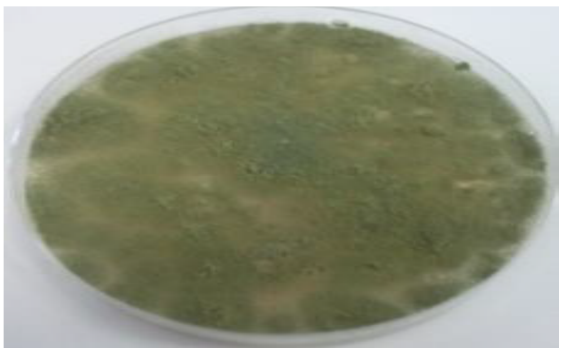
III.2.2.1.Identification de quelques souches de moisissures

III.2.2.1.1.Caractérisation phénotypique des souches

Selon**Botton**e*tal* **(1990),** l'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères culturaux et morphologiques : Les caractères culturaux reposent sur des critères macroscopiques tels, la vitesse de croissance, la texture, la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture, l'odeur, l'exsudat et la présence d'un pigment diffusible. Les caractères morphologiques est une étude microscopique du mycélium, la nature des organes différenciés et l'étude biométrique.

L'inventaire fongique de la flore contaminant notre échantillon a révélé un cortège floristique fongique très diversifié (tableau 2).

Tableau 2. Caractères phénotypiques de quelques moisissures sélectionnées.

Les souches	Relief	Couleur	Vitesse de croissance	Aspect macroscopique
S_3J_3	plane	vert cotonneuse, revers blanc	Rapide (72h)	
S_1J_7	plane	vert militaire, revers blanc	Rapide (72h)	
S_4J_{15}	plane	vert	Rapide (72h)	
S : souche ; J : jour				

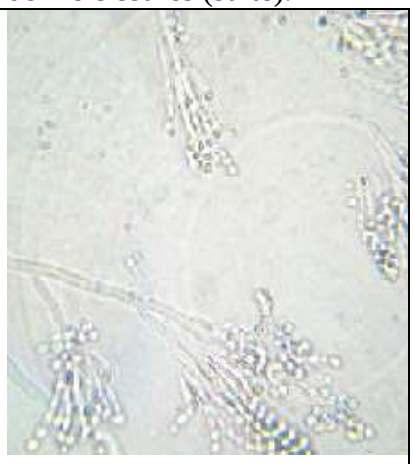
III.2.2.1.2. Identification du genre par la méthode de micro-culture

Cette étape vise à la détection précise tant qualitative que quantitative de la communauté fongique contaminant le kaddid.L'examen microscopique est effectué par la méthode de micro culture décrite par **Haris (1989).**L'identification des genres fongiques repose sur des critères morphologiques tels les aspects macroscopiques et microscopiques du mycélium des structures reproductrices. La couleur s'avère un critère de choix dans L'identification des genres fongiques a été réalisée selon les clés de détermination de (**Zillinsky, 1983 ; Botton *et* *al.*, 1990; Lepoivre, 2003; Nasraoui, 2006)**les genres suivants ont été identifiés : *Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Alternaria.*

Tableau 3. L'identification microscopique de quelques souches de moisissures.

Les souches	Caractère microscopique	Genre	Aspect microscopique
S_3J_3	Le mycélium de type cloisonné portant de nombreux conidiophores isolés, ramifiés, terminés par un pénicille ; Pénicille constitue de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiospores	*Penicillium*sp	
S_4J_{15}	Le mycélium de type cloisonné portant de nombreux conidiophores isolés, ramifiés, terminés par un pénicille ; Pénicille constitue de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiospores	*Penicilium*sp	
S_1J_7	le mycélium: de type non cloisonné conidies : pluricellulaires en chaines brunes irrégulières ; en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement	*Alternaria*sp	

Tableau 3. L'identification microscopique de quelques souches de moisissures (suite).

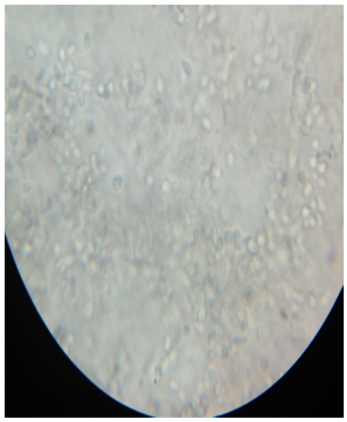
S_6J_{15}	Mycélium cloisonné. ➢ **Conidies :** Pluricellulaires et rondes. ➢ Présence d'une tête aspergillaire	*Aspergilus*sp	
S : souche ; J : jour			

III.2.2.2. Identification des levures

III.2.2.2.1. Les caractères culturaux

Les caractères culturaux sont étudiés sur le milieu PDA. Le milieu PDA permet de définir la taille des colonies, leur forme (contour net ou irrégulier, convexe ou concave), leur aspect (mat ou brillant).et leur pigmentation. Les cultures sont incubées pendant trois jours à 28 °C, examinées à l'œil nu.

Tableau 4. Identification macroscopique et microscopique des levures.

La souche	**Aspect microscopique**	**Aspect macroscopique**	**caractère**	**identification**
S_3 J_0		 - colonie blanche et mat. - pourtour régulier.	- Levures rondes ou ovales (4 µm) à bourgeonnement multipolaire, **capsulées** . - Absence de mycélium	*Cryptococcus*sp

III.2.2.2.2. Les caractères morphologiques

La morphologie cellulaire et le mode de reproduction végétative des levures isolées sont observés à l'état frais ou après coloration au microscope. La coloration met en évidence le type de reproduction chez les levures. Une parcelle de colonie est émulsionnée dans une goutte de lactophénol, puis la préparation est examinée au microscope.

Au cours de la maturation dukaddid, cinq (5) souches de levure sont isolées. Dont une souche est préservée pour finir l'étude, sa colonie de couleur blanche et mat. L'observation au microscope de leurs cellules, colorées au bleu de méthylène, montre des formes ovales. A l'état frais les présentent des pseudomycéliums avec des bourgeonnements multilatéraux et sans aucune forme sporale. Ces résultats sont conformes à ceux donnés par **DaviseLarone (1987)** pour le genre *Cryptococcus.*

III. 3. Etude de la flore lactique autochtone du kaddid

III.3.1. Dénombrement de la flore lactique

Les résultats de l'étude de développement de la flore lactique sont consignés dans le tableau 1 (voir l'annexe III).

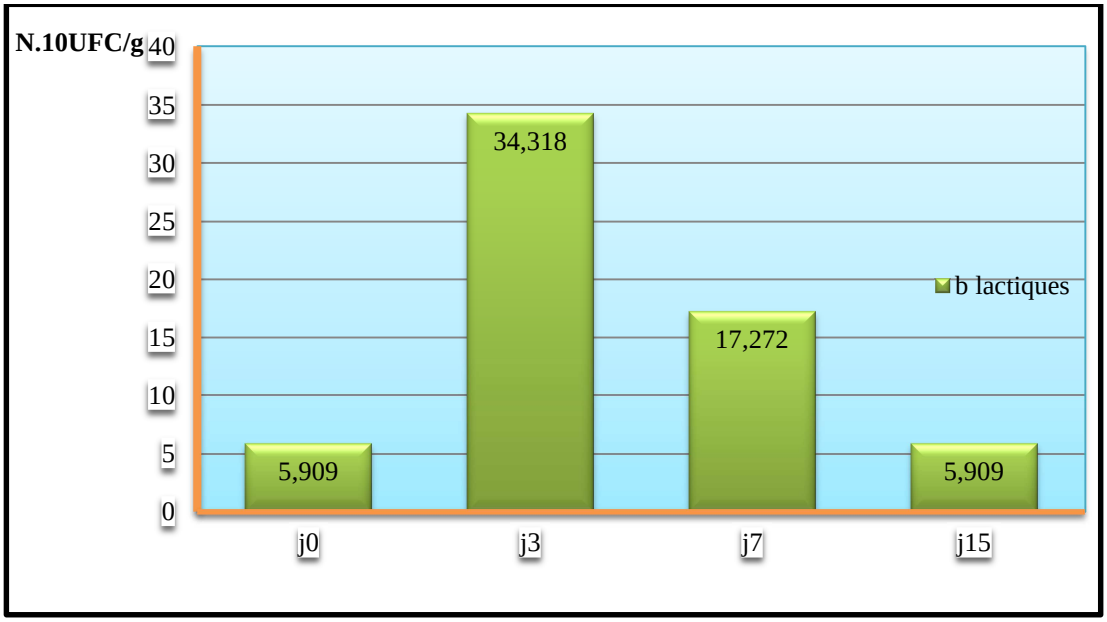


Figure 14. Résultats de l'évolution de la flore lactique au cours de la maturation du kaddid.

Le nombre de colonies le plus élevé est observé à J_3, et les plusfaible nombre sont enregistrés au J_0 etau J_{15}. Selon **Bourgeois** et **Larpent (1996)**, la croissancedes lactobacilles est favorisée par des pH de 6,4 à 5,5 mais elle est limitée avec des pHinférieurs à 4,5 (plus acide).

Le milieu MRS **(de Man *et al.*, 1960)**, est un milieu complexe et très riche, il estcouramment utilisé pour cultiver les bactéries lactiques auxotrophes. Cependant, ce milieucontient des sources

en osmoprotectants (extraits de levure, extraits de viande, peptones) pouvant minimiser l'impact des stress, notamment celui du stress salin **(Baliarda, 2003).**

En générale,la viande est considérée comme un aliment de choix en raison de sa haute valeur nutritive. Sa richesse en protéines et la nature de celles-ci en font un aliment indispensable pour une ration alimentaire équilibrée. Cependant, en raison même de ses qualités nutritionnelles, la viande constitue également un milieu très favorable à la croissance de la plupart des microorganismes **(Jay, 2000)**.Cet aliment est un produit plus sensible à l'altération par les micro-organismes, ces derniers sont liés par les principaux facteurs physicochimiques qui constituent l'ensemble des conditions environnementales **(Gacem, 2011)**, c'est-à-dire la température joue un rôle prépondérant sur la croissance et la physiologie des bactéries lactiques, Compte tenu des températures habituellement rencontrées dans les denrées alimentaires, comprises généralement entre 0 ºC et 35ºC **(Andre, 2007)**, et la teneur en eau et acidité titrable et l'humidité et l'activité d'eau. Ces facteurs d'appropriation pour le développement des flores lactiquesconfirment nos résultats.

III.3.1.2.Isolement et purification des souches lactique

Au cours de la maturation du kaddid on a étudié le développement de la flore lactique (FL). Un total de vingt-neuf (29) souches ont été isolées et purifiées sur milieu MRS. Sur gélose, les isolats sont apparus de taille variable avec un pourtour régulier ou irrégulier, souvent sous forme circulaire, de couleurs blanchâtres, grisâtres, marron ou transparentes.

La purification des souches lactiques isolées par plusieurs repiquages successifs sur milieu MRS (alternant sur milieux liquide), Sur bouillon, les souches présentent un trouble homogène qui caractérise le groupe des bactéries lactiques, avec la formation d'un précipité au fond du tube et une zone claire à surface du liquide on a obtenu 29 souches pures du kaddid, les colonies sont d'un aspect (couleur, taille et forme) typique et homogènes, ils ont été gardées pour la suite de l'étude **(photo 2 boite de colonies).**

III.3.1.3.Pré-identification au niveau du genre des souches lactique

Lors de cette étude nous avons identifié les souches isolées au niveau du genre par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

III.3.1.3.1.Caractérisation phénotypique des souches

Ces tests sont effectués pour but de déterminer le genre des souches isolées. Les colonies sont apparues de taille variable avec un pourtour régulier ou irrégulier, lenticulaire et souvent sous forme circulaire, de couleurs blanchâtres, grisâtres, marron ou transparentes (photo 2)**.**



Photo 2. L'aspect macroscopique de la souche sur milieu MRS.

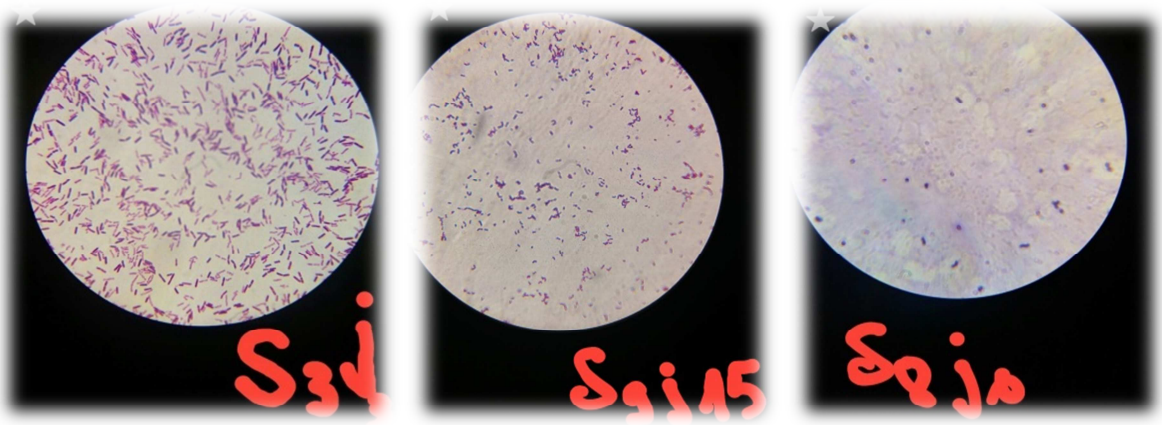
Sur milieu liquide, la croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble homogène fumeux, avec la formation d'un précipité au fond du tube et une zone claire à surface du liquide. Ce trouble est concentré au fond du tube à la recherche des conditions anaérobiques de ces bactéries**(Carr *et al*,2002).**



Photo 3. Aspect d'une culture pure dans un milieu liquide.

III.3.1.3.2. Caractérisation microscopique

L'étude microscopique est basée sur la coloration de Gram **(Photo 4)**. L'observation microscopique a montré que les isolats sont à Gram positif, apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'associations. Cette observation a révélé la présence des cellules immobiles de la forme cocci (isolés, diplocoque, tétrades), bacilles ou coccobacille.Les résultats de l'examen microscopique sont illustrés dans le tableau 5.



(a) (b) (c)

Photo 4. Observation microscopique des souches lactiques avec un grossissement (G : 10x100)

[(a)]:*Enterococcus* (S_3J_0); [(b)] : *Pediococcus*(S_9J_{15}) ; [(c)] : *Leuconostoc*(S_8J_0).

III.3.1.3.3. Production de la catalase

L'activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau, par la mise en contact des colonies avec quelques gouttes d'eau oxygénée **(Guiraud, 2003)**.Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester **(Guiraud, 2003)**. Tous les isolats lactiques sont à catalase négative car l'absence de dégagement gazeux (O_2) ou pseudo-catalase (réaction intermédiaire).

III.3.1.3.4. Résultats des tests physiologiques

Les résultats des tests physiologiques sont résumés dans Le tableau 5.Pour l'identification de genre des souches isolées, la clé dichotomique de différenciation des genres des bactéries lactiques des viandes de **Carr** et*al***. (2002**) ainsi que le tableau (5) des caractères différentiels de **Von Wright** et **Axelsson (2012)** ont été utilisés.

- **Croissance dans les conditions hostiles** (**en différents température, pH, NaCl)**

Ce test est réalisé dans le but de différencier les Lactocoques des Entérocoques, Nous avons remarqué que la majorité des souches testées capable de croitre sur milieu MRS liquide à pH 4 et 9 (Photo 5). Pour des concentrations différentes de NaCl la pluparts des isolas poussent à 4% et a 6.5% de Na Cl (Photo 5). Toutes les souches poussent à température 10C°, seulement 6 souches ne se multiplier pas à 45C° et la plut parts des souches sont capables de se multiplier à la température 45 ºC à l'exception de 6 souches Ce qui assure que ces souches sont mésophiles en générales(Tableau 5).

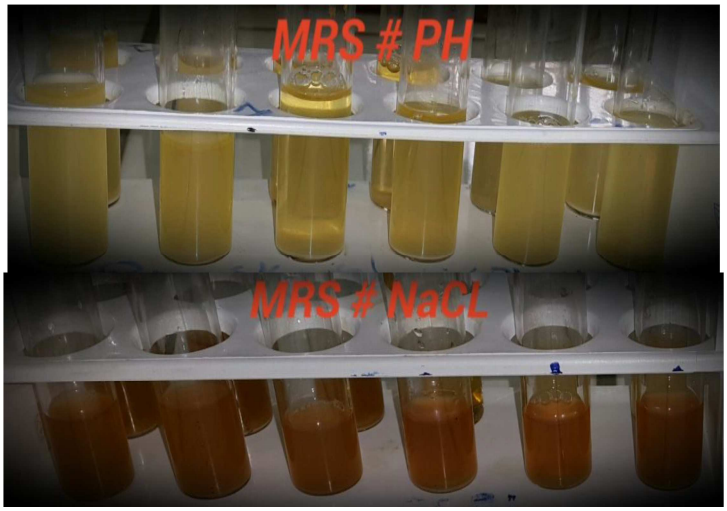


Photo 5: Résultat des tests physiologique (différents pH, et concentrations en Nacl).

- **Type fermentaire**

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la formation de CO_2 qui est piégé en milieu Gibson et Abdemalek. Ce test permet de différencier les isolats homolactiques des hétérolactiques après une incubation à 27°C pendant 24 heures jusqu'à 72 heures **(Hassaine O, 2013)**. La plus parts des souches sont homofermentaires qui fermentent le sucre en lactate sans produire du gaz, et les autres souches sont hétérofermentaires où il y a un dégagement du gaz. (Photo 6).

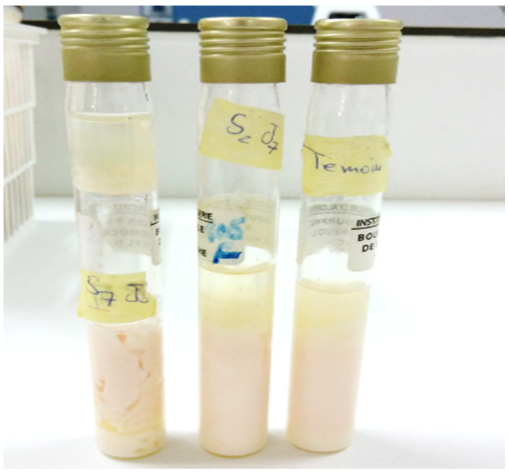


Photo 6. Le type fermentaire du glucose des souches lactiques sur milieu Gibson et Abdelmalek

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de *Lactococcus*, *Pediococcus* ainsi que certains *Lactobacillus*. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. **(Thompson** et*al.*, **1994).**

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO_2 sont dites hétérofermentaires. Les groupes principaux de bactéries

présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc* et certains *Lactobacillus*. Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA et le système de transport PTS **(Thompson** et*al.*, **1994).**

Les résultats relatifs au milieu MRS illustrés dans la Figure 18 et le tableau **5.** Indiquent que les genres les plus prédominants sont *Leuconostoc*au(J_0, J_3, J_7) avec un pourcentage maximal similaire de 100 %, d'autre part, les *Lactobacillus* ont enregistré un pourcentage dans tous les jours, d'un autre côté, les *Pediococcus* ont apparus un pourcentage de 50 % dans au J_{15}. Les *Enterococcus* ont montré le développement seulement le J_0, et *Lactococcus* seulement au J_7 et J_{15}.

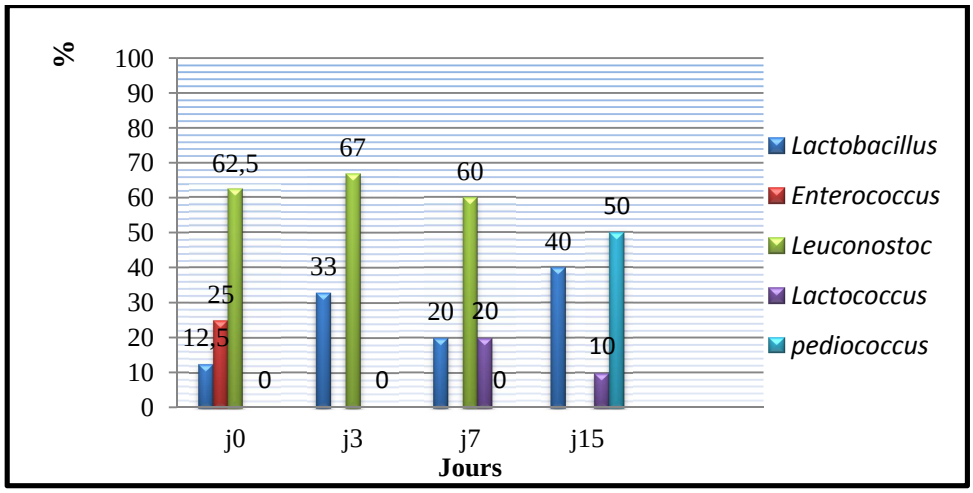


Figure 15. Répartition des genres de la collection lactique (%) au cours de la maturation du kaddid.

La forme des cellules est le caractère morphologique le plus important pour différencier entre les bacilles et les coques lactiques **(**Photo 3), sur les 29 isolats, 8 souches avec un pourcentage 27.59% sont des coccobacilles ou bacilles et 55.17 % des isolats sont des coques lactiques. 75.86 % des isolats sont des souches hétérofermentaires (Tableau 5).

Parmi les coques lactiques, 5 souches sont des cocci en tétrades, homofermentaires et poussent à 45 °C et à 6,5 % de sel. Elles sont présumées du genre *Pediococcus*.

Deux (2) souches coccihomofermentaires, poussent à 10 °C, mais pas à 45 °C, elles sont attachées au genre *Lactococcus*.

Douze (12) souche cocci présente un caractère hétérofermentaire ont été orienté vers le genre *Leuconostoc*.

Deux (2) souches ont la capacité de poussées à 10 °C et 45 °C, 6,5 % de Nacl et au pH 4 et 9,6, elles sont considérées appartenant au genre *Enterococcus*.

Tableau 5. Identification du genre de la collection des souches lactiques.

	Isolats	Caractéristiques								
Les jours		Forme	pH4	pH9,6	4% NaCl	6,5% NaCl	45°C	10°C	Fermentation	Identification
J_0	S1	Coccobacille	+/-	+	+/-	-	+	+	Hétéro	*Lactobacillus*
	S2	Cocci	-	+	+/-	-	+	+	Hétéro	*Leuconostoc*
	S3	Cocci	+	+/-	+/-	+/-	+	+	Homo	*Enterococcus*
	S4	Cocci	+	+/-	+	+	+	+	Hétéro	*Leuconostoc*
	S5	Cocci	+	+	+	+	+	+	Hétéro	*Leuconostoc*
	S6	Cocci	+	+/-	+	+/-	+	+	Homo	*Enterococcus*
	S7	Cocci	+	+	+	+/-	+	-	Hétéro	*Leuconostoc*
	S8	Cocci	+/-	+	+	+	+	+	Hétéro	*Leuconostoc*
J_3	S1	Cocci	-	+	+/-	+/-	+	-	Hétéro	*Leuconostoc*
	S2	Cocci	+	-	+	+/-	+	+	Hétéro	*Leuconostoc*
	S3	Bacille	+	+	+	+	+	+	Hétéro	*Lactobacillus*
	S4	Coccobacille	+	+/-	+	+	+	+	Hétéro	*Lactobacillus*
	S5	Cocci	+	+	+	+/-	+	+	Hétéro	*Leuconostoc*
	S6	Cocci	-	+/-	+/-	-	+	+	Hétéro	*Leuconostoc*
J_7	S1	Cocci	-	+/-	+/-	-	+	-	Hétéro	*Leuconostoc*
	S2	Cocci	-	+/-	-	-	-	+	Homo	*Lactococcus*
	S3	Coccobacille	-	+	+/-	+/-	-	+	Hétéro	*Lactobacillus*
	S4	Cocci	-	+	+/-	+/-	+	+	Hétéro	*Leuconostoc*
	S5	Cocci	-	+	+/-	-	+	-	Hétéro	*Leuconostoc*
J+15	S1	Cocci (tétrade)	+	-	+	+	+	+	Hétéro	*Pediococcus*
	S2	Cocci (tétrade)	+	+	+	+	+	-	Hétéro	*Pediococcus*
	S3	Cocci (tétrade)	-	+	+	+	-	-	Homo	*Pediococcus*
	S4	Cocci	-	+	+	+	-	+	Homo	*Lactococcus*
	S5	Bacille	-	-	+/-	+/-	-	+	Hétéro	*Lactobacilus*
	S6	Cocci (tétrade)	+/-	+	+	+	-	+	Homo	*Pediococcus*
	S7	Bacille	+/-	+	+	-	-	+	*Hétéro*	*Lactobacillus*
	S8	Bacille	-	+	+/-	-	+	+	Hétéro	*Lactobacillus*
	S9	Cocci (tétrade)	+	+	+	+	-	+	Hétéro	*Pediococcus*
	S10	Bacille	+	+	+	+	+	-	Homo	*Lactobacillus*

S : souche ; J : jour

Parmi la collection des bacilles lactiques, 7 souches (24.14 %) sont identifiées comme *Lactobacillus*hétérofermentaires (Betabacterium), et une (1) souche (3.45%) sont des *Lactobacillus*homofermentaires, tous les bacilles sont rattachés au genre *Lactobacillus*, le genre *Carnobacterium* a été exclu à raison de ses conditions de culture spécifique.

.

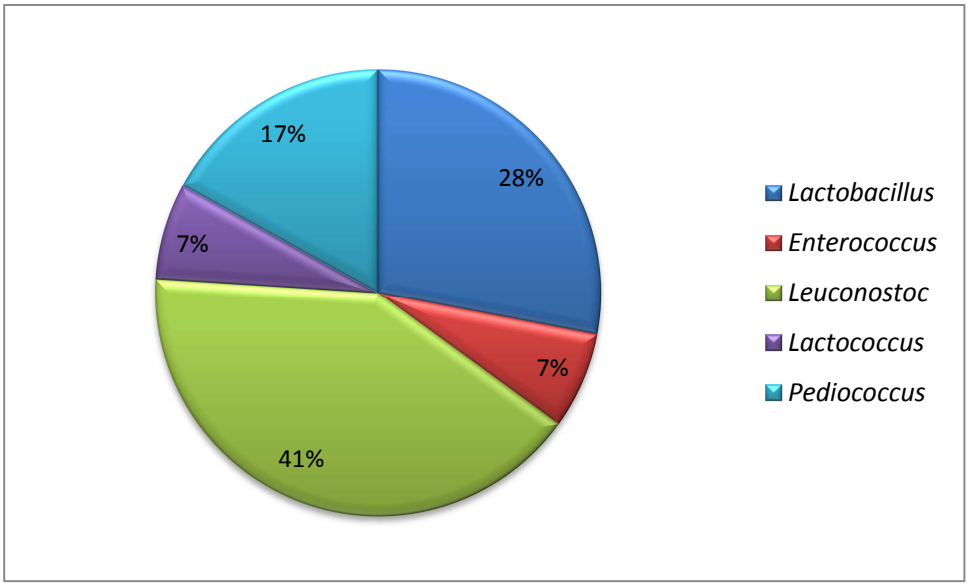


Figure 16. Répartition des genres de la collection lactique (%).

D'après la figure 16, nous pouvons noter la dominance du genre*Leuconostoc*(41 %), alors que le genre *Lactobacillus* occupe un pourcentage de 28 %, vient ensuite le genre *Pediococcus*(17%), et le genre *Lactococcus*(7 %), enfin le genre *Enterococcus*(7%).

L'identification de29 souches lactiques isolées de kaddid Tunisien par la technique del'ADN-ribosomial par **Ben Belgacem et *al*. (2009)** a montré la présence de *Lactococcuslactis*, *Enterococcusfaecium*, *En.faecalis*, *En.sanguinicola*, *En.hawaiiensis*, *Lactobacillus sakei*, *Lb.curvatus*, *Lb.plantarum*, *Lb.alimentarius*, *Pediococcuspentosaceus*, et *Weissellaconfusa*. Cette identification se concorde avec nos résultats en termes de genres lactiques trouvés dans le kaddidPréparé selon la méthode saharienne. Le genre *Enterococcus*est habituellement présent en grand nombre dans la viande fraiche où fermentée, aussi il est fréquemment isolé des saucisses fermentées sans culture starter (**Franz et *al*., 2003**; **Hugas et *al*., 2003**).

Dans notre étude le genre*Leuconostoc*quantitativement est plus important que le genre*Lactobacillus* ce quin'est pas en accord avec les résultats de **Ben Belgacem et *al*. (2009)**.dont il atrouvé le genre *Enterococcus* plus que les *Lactobacillus*.Uneétude sur la microflore de certains produits carnés préservés au Himalaya a montré ladominance d'*Enterococcus*, suivi par les genres *Pediococcus*, *Leuconostoc*et *Weissella***(Okiet*al*., 2011)**. Par ailleurs, certaines études ont rapporté la présence de populationsd'*Enterococcus*et de *Lactobacillus* en proportions similaires (**Marty** et*al*., **2012**; **Landeta**et*al*., **2013**). D'autre part, des travaux sur la microflore des produits carnés fermentés ontmontré la dominance de genre *Lactobacillus* dans les saucisses artisanales en France (**Ammor**et*al*., **2005**), et dans le *lacón*(produit carné traditionnel Espagnol) (**Lorenzo et *al*., 2010**).

Très peu d'étude sur les produits carnés qui ont rapporté l'isolement du genre *Lactococcus*etque les souches isolées se trouvent en faible nombre, en citant à titre d'exemple l'isolement del'espèce *Lactococcuslactis*par **Ben Belgacem** et*al***. (2009)**, et l'espèce *Lc.garvieae*par**Lorenzo et** *al***. (2010)**.

Le genre *Pediococcus*constitue 17% de notre souchier alors que cette proportion est de8,8 % dans le kaddid Tunisien **(Ben Belgacem** et*al***., 2009)**, ce genre est fréquemment isolé àpartir des saucisses Européens mais en faible pourcentage. Ils sont plus commun dans les saucisses des Etats-Unies ou ils sont utilisés comme cultures starters (**Leroy** et*al.*, **2006**). Legenre *Leuconostoc*et*Weissella*ne sont pas cités fréquemment dans les travaux de recherche,ils sont généralement associées aux produits carnés, mais en très faible nombre (**Lorenzo** et*al***., 2010**).

Il faut noter ici que, l'identification microscopique et physiologique est très limitée et, l'utilisation des tests biochimiques et des techniques moléculaires apportent plus de description de la biodiversité microbienne cultivable du kaddid.

III.4. Sélection des isolats lactiques à activité antifongique

La recherche de l'activité antifongique des bactéries lactique envers les souches fongiques a été recherchée par la méthode de doubles couches (contacte directe), chez 29 souches lactiques isolées au cours développementde la viande fraiche en kaddidcontre quatre (4) isolats fongiques.Les résultats ont montrés que environ de 23 isolats présentaient une activité antifongiques(voir tableau6) dont sept (7) isolats lactiques (S_7J_0,S_6J_0,S_1J_3,S_3J_3,S_1J_{15},S_5J_1,S_6J_{15}) ont fait l'objet de complément d'étude (voir tableau 7).

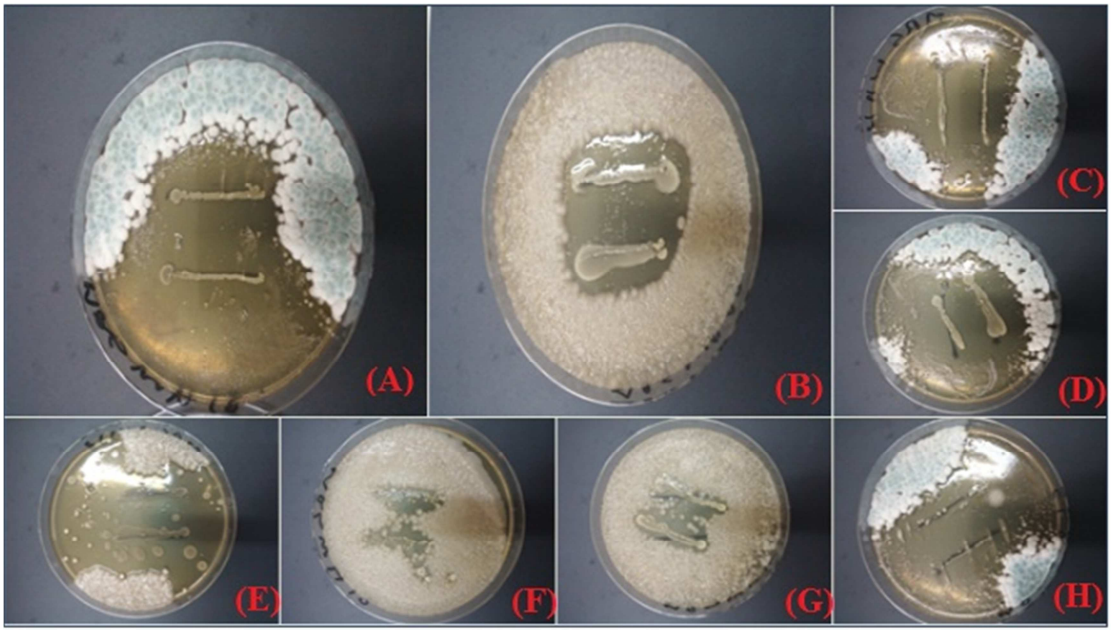


Photo 7. Inhibition de *Penicillium* (S_4J_{15}) et *Cryptococcus*(S_3J_0)par *Lactobacillus, Leuconostoc,Pediococcus et Enterococcus.*

(A): *Leuconostoc*S_7J_0; (B): *Enterococcus* S_6J_0; (C): *Lactobacillus* S_3J_3; (D): *Enterococcus* S_6J_0
(E):*Pediococcus*S_1J_{15};(F):*Lactobacillus*S_5J_{15};(G):*Leuconostoc*S_1J3;(H):*Pediococcus*S_6J_{15}.

.

Tableau 6. Activité antifongique des souches lactiques par contact direct.

Souche lactiques actives	Souches fongiques	Activité antifongique
LactobacillusS_1J_0	*Cryptococcus*S_3J_0	-
	PeniciliumS_4J_{15}	-
LeuconostocS_2J_0	*Cryptococcus* S_3J_0	-
	PeniciliumS_4J_{15}	-
EnterococcusS_3J_0	*Cryptococcus* S_3J_0	-
	PeniciliumS_4J_{15}	-
LeuconostocS_4J_0	*Cryptococcus* S_3J_0	-
	PeniciliumS_4J_{15}	-
LeuconostocS_5J_0	*Cryptococcus* S_3J_0	+
	PeniciliumS_4J_{15}	++
EnterococcusS_6J_0	*Cryptococcus*S_3J_0	++
	PeniciliumS_4J_{15}	+++
Leuconostoc S_7J_0	*Cryptococcus* S_3J_0	-
	PenicilliumS_4J_{15}	+++
LeuconostocS_8J_0	*Cryptococcus* S_3J_0	-
	PeniciliumS_4J_{15}	+
LeuconostocS_1J_3	*Cryptococcus*S_3J_0	+
	PeniciliumS_4J_{15}	-
LeuconostocS_2J_3	*Cryptococcus* S_3J_0	++
	PenicilliumS_4J_{15}	-
Lactobacillus S_3J_3	*Cryptococcus* S_3J_0	-
	PeniciliumS_4J_{15}	+++
LactobacillusS_4J_3	*Cryptococcus* S_3J_0	-
	PenicilliumS_4J_{15}	++
LeuconostocS_5J_3	*Cryptococcus* S_3J_0	-
	PenicilliumS_4J_{15}	+++
LeuconostocS_6J_3	*Cryptococcus* S_3J_0	++
	PenicilliumS_4J_{15}	+++
LeuconostocS_1J_7	*Cryptococcus* S_3J_0	++
	PenicilliumS_4J_{15}	+++
LactococcusS_2J_7	*Cryptococcus* S_3J_0	+
	PenicilliumS_4J_{15}	-
LactobacillusS_3J_7	*Cryptococcus* S_3J_0	++
	PenicilliumS_4J_{15}	-
LeuconostocS_4J_7	*Cryptococcus* S_3J_0	+
	PenicilliumS_4J_{15}	-
LeuconostocS_5J_7	*Cryptococcus* S_3J_0	-
	PenicilliumS_4J_{15}	+++
PediococcusS_1J_{15}	*Cryptococcus* S_3J_0	+++
	PenicilliumS_4J_{15}	-
PediococcusS_2J_{15}	*Cryptococcus* S_3J_0	+
	PenicilliumS_4J_{15}	-
PediococcusS_3J_{15}	*Cryptococcus* S_3J_0	+
	PenicilliumS_4J_{15}	-
LactococcusS_4J_{15}	*Cryptococcus* S_3J_0	+

	PenicilliumS_4J_{15}	-
LactobacilusS_5J_{15}	*Cryptococcus* S_3J_0	+
	PenicilliumS_4J_{15}	-
Pediococcus S_6J_{15}	*Cryptococcus* S_3J_0	-
	PeniciliumS_4J_{15}	+++
LactobacillusS_7J_{15}	*Cryptococcus* S_3J_0	-
	PenicilliumS_4J_{15}	-
LactobacillusS_8J_{15}	*Cryptococcus* S_3J_0	+
	PenicilliumS_4J_{15}	-
PediococcusS_9J_{15}	*Cryptococcus* S_3J_0	-
	PenicilliumS_4J_{15}	-
Lactobacillus$S_{10}J_{15}$	*Cryptococcus* S_3J_0	-
	PenicilliumS_4J_{15}	-
(-) absence d'une zone d'inhibition (+) zone d'inhibition comprise 0,5 à 1cm de la boite de Pétri (++) zone d'inhibition supérieur 1cm de la boite de Pétri (+++) zone d'inhibition comprise 4 cm, S : souche, J : jour		

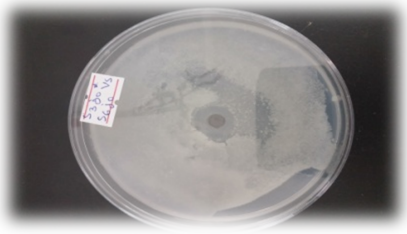
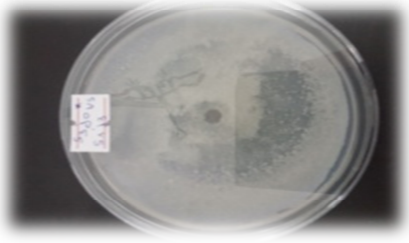
D'après le tableau on remarque que la majorité des bactéries qui ont développé une activité antifongique sont répartis aux genres:5souches *Lactobacillu*s de 17.24%(S3J3, S_4J_3, S_3J_7, S_5J_{15}, S_8J_{15}) ,4 souches *Pediococcus*de13.8%%(S_1J_{15}, S2J15, S_3J_{15},S_6J_{15}),2souches*Lactococcus de* 6.7%(s2j7,s4j15),9 souches*Leuconostoc*de 31.03%(S_5J_0, S_7J_0, S_8J_0, S_1J_3, S_2J_3, S_5J_3, S_6J_3, S_1J_7, S_5J_7),3.44% souche(S_6J_0).

Les souches performantes ont montré que leurs colonies inhibaient les contaminants endogènes des moisissures du genre *Penicillium*(S_4J_{15})et levure du genre*Cryptococcus*(S_3J_0). Une souche lactique *Enterococcus*(S_6J_0) de la collection possédait de propriété anti-levure.

III.5. Etude de la nature de l'agent inhibiteur des souches actives

La présence de zones d'inhibition auteur souches sélectionnées par contacte directe, peut avoir plusieurs origines parmi lesquelles, nous pouvons mentionner la compétition cellulaire, la production des acides organiques, den peroxyde d'hydrogène, etc(**Yaakoubi et *al*., 2009**). Les surnageants des souches actives sont étudiés pour mettre en évidence naturedes métabolitesantifongiques.

Tableau 7. Détermination de l'activité antifongique des surnageants natifs (mm).

souches lactique	souches fongique	Diamètre (mm)	Activité
*Enterococcus***S_6J_0**	*Cryptococcus*S_3J_0	10	
*Lactobacillus***S_3J_3**	*Penicillium*S_4J_{15}	4	
*Leuconostoc***S_1J_3**	*Cryptococcus*S_3J_0	5	
*Enterococcus***S_6J_0**	*Penicillium*S_4J_{15}	3	
S : souche ; J : jour			

L'étude des propriétés antifongiques dessurnageants natifs des souches actives par interaction directe montrait que seuls les surnageants de culture de*Enterococcus*S_6J_0 et *Leuconostoc*S_1J_3ainsi que*Lactobacillus* S_3J_3inhibaient fortement *Penicillium* (S_4J_{15}).

L'étude a été réalisée sur le surnageant des souches actives a montré que leurs surnageants n'ont pas le même spectre d'inhibition, en effet, ce phénomène proviendrait du fait que des concentrations plus importantes sont retrouvées localement, autour des colonies bactériennes **(Sjögren**et*al.,* **2003)**, de même, dans les méthodes de contacte directe la compétition cellulaire est très remarqué.

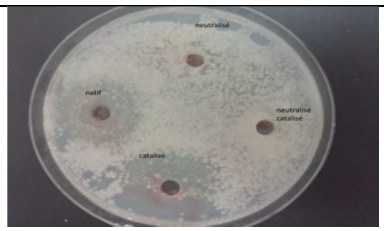
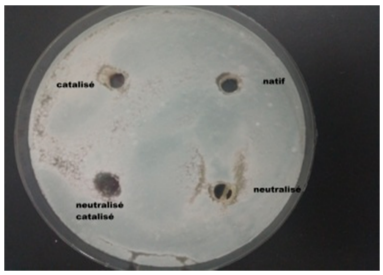
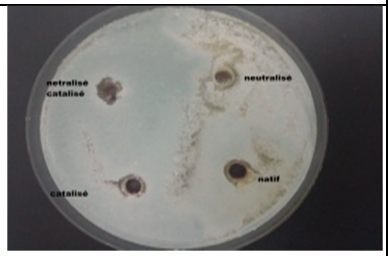
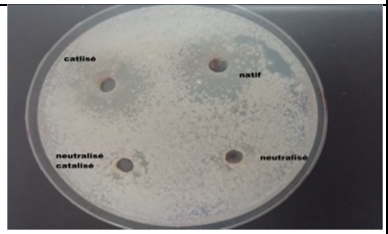
L'étape de la sélection par contacte directe a également montré que pour une même souche lactique, l'activité inhibitrice contre une moisissure appartenant au même genre ou à une même espèce présentait des différences démontrant que l'activité inhibitrice est dépendante de la souche

considérée comme la souche *Enterococcus*S_6J_0 possédait une activité à la fois antilevure et antimoisissure.(**Dora ndango 2012**).

III.5.1. Caractérisation partielle des métabolites antifongiques

Dans ce screening on a pris en compte uniquement les souches *Enterococcus*S_6J_0, *Lactobacillus*S_3J_3*Leuconostoc*S_1J_3,qui ont dessurnageants natifs potentiellement actifs sur les souches fongiques indicatrices *Cryptococcus*S_3J_0, *Penicillium* S_4J_{15}, Après élimination de l'effet des acides organiques et le peroxyde d'hydrogène, lessurnageants traités ont été testés pour leur activité inhibitrice contre les germes tests. Lesrésultats sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8. Activité inhibitrice des surnageants traités (mm).

souches lactiques	**souches indicatrices**	**Surnageants**				**Activité**	**inhibiteurs majeur**
		nat	**cat**	**neut**	**cat+neut**		
Enterococcus S_6J_0	*Cryptococcus* S_3J_0	13	17	**0**	**0**		Acide organique
Enterococcus S_6J_0	*Penicilium* S_4J_{15}	3	**0**	33	**0**		H_2O_2
Leuconostoc S_3J_3	*Penicilium* S_4J_{15}	3	3	1	2		Acide organiques+ autre substances
Lactobacillus S_1J_3	*Cryptococcus* S_3J_0	15	14	**0**	**0**		Acide organique

S : souche, J : jour, nat : surnageant natif, cat : surnagent catalisé, neut : surnagent neutralisé, cat+neut : surnagent neutralisé et catalisé.

D'après le tableau l'identification des métabolites nous a permet de caractériser les acides organique comme inhibiteur majeur de la souche*Enterococcus*(S_6J_0) contre la souchePenicilienne(S_4J_{15}), ainsi pour les *Lactobacillus*(S_1J_3)et*Enterococcus*(S_6J_0) on a identifié le peroxyde d'hydrogène comme leur inhibiteur majeur antilevure vis-à-vis la souche*Cryptococcus*S_3J_0. D'autre part, les métabolites anti-*Penicillium* la souche *Leuconostocs*(S_3J_3) sont identifiéscomme des acides organiques avec d'autres substances.

L'activité antifongique de souches du genre *Lactobacillus* a été élucidée par quelques études. **Ho** et*al***. (2009)**, ont trouvé que certaines souches de *Lactobacillus* isolées des produits végétaux fermentés avaient une forte activité telles *Lb.plantarum*(HA3 et HA9) et *Lb.fermentum*(HA7), et d'autres ont une faible activité telles *Lb.acidophilus*(HA4 et HA12) et *Lb.brevis*(HA11).

Gerezet*al***. (2009)** ont prouvé que l'activité antifongique de quatre souches *Lb.plantarum*CRL 778, *Lb.reuteri*CRL 1100, et *Lb.brevis*CRL 772 et CRL 796 contre *Penicillium* est liée en majeure partie à des composées inhibiteurs, l'acide acétique et l'acide phénylique. Les résultats de l'étude menée sur l'activité antifongique de 87 souches de *Lb.plantarum*, 4 souches *Pediococcuspentosaceous*et 3 souches *Weissellaconfusa*contre *Penicillium expansum, P.digitatum, P.notatum,P.roqueforti, Rhizopusstolonifer, Fusariumculmorum, Aspergillus fumigatus*et *Rhodotorulamucilaginosa*par **Crowley** et*al***. (2012)** ont montré que deux souches de *Lb.plantarum*inhibent partiellement les souches fongiques et que cela est lié à la production des acidesorganiques dont l'identification de ces derniers par HPLC a révélé la présence de l'acideacétique, lactique et phénylique en taux insuffisant pour contribuer à une activité antifongiqueefficace.

Le rôle des acides organiques comme composés antifongiques est devenu plus visible avec l'acide phénylique, les hydroxylates et les acides gras identifiés comme composés antifongiques produits par certaines souches de bactéries lactiques (**Prema**et*al***., 2010**). Par ailleurs, une gamme d'acides organiques tels les acides acétique, formique, caproïque, propionique, butyrique et valérique libérés par *Lb.sanfranciscensis*CB1, possèdent le même effet contre *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Monilia*. Ces acides agissent d'une manière synergique (**Lavermicocca**et*al***., 2003** ; **Gobbetti**et *al***., 2005**).

Le nombre d'études publiées sur l'effet antifongique des bactéries lactiques est encore faible et la majorité des travaux décrit uniquement l'action inhibitrice de ces bactéries. À notre connaissance, très peu d'études ont été menées sur la caractérisation des composés ou du mécanisme d'action sauf ceux publiés par **Gerez et** *al***. (2009)**, **Prema et** *al***. (2010)**, **Hongjuan**et*al***. (2012)** et **Crowley** et*al***. (2012**), dont il apparait clairement dans la majorité de ces publications que les souches lactiques étudiées sont du genre *Lactobacillus*.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

La biopréservation par l'utilisation des microorganismes bioprotecteurs et/ou leurs métabolites est une méthode de conservation des aliments qui consiste à inoculer un produit alimentaire avec des souches sélectionnées, de manière à inhiber la croissance des microorganismes indésirables. Elle est destinée à être utilisée dans le cadre de la technologie des barrières, c'est-à-dire en combinaison avec d'autres méthodes douces de préservation (salage, séchage, réfrigération, etc.). Les bactéries lactiques occupent une place très importante dans notre vie douées de plusieurs activités, elles sont considérées comme additif alimentaires ou elles sont trouvées naturellement dans le produit. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la recherche des souches lactiques autochtones de *Kaddid* avec des potentialités antifongiques vis-à-vis des contaminants endogènes.

A travers les résultats obtenus par la mesure des différents analyses physicochimiques complémentaires, nous constatons changement du pH de la viande fraîche jusqu'au produit fini, le pH allant de 5,15 à 5,65, Ainsi qu'une augmentation de l'acidité, cette augmentation a variée de 0,4% à 2,2%. Nous avons observé une augmentation de la matière sèche durant toute la durée de la maturation qui variée de 35% à 98% à J_{15}, suivie par une diminution de la teneur en eau (TE) qui passe de 65% de la viande fraiche à une valeur de 2% après 15 jours de séchage, en parallèle l'a_w varie de 0.85% à 0.17% et l'humidité de 58% à 1.5% après 15 jours de séchage.

Cette étude nous a permis aussi de constituer un souchier de bactéries lactiques et d'avoir une idée sur la composition de la flore lactique du kaddid. Au total, 29 isolats ont été identifiés au niveau du genre par des approches morphologiques et physiologiques. Cette identification révèle la dominance du genre *Leuconostoc* (41%), alors que le genre *Lactobacillus* occupe un pourcentage de 28%, viennent ensuite le genre *Pediococcus* (17%), et le genre *Lactococcus* (7%), enfin le genre *Enterococcus* (7 %).

D'autre part, a partir de 24 souches fongique contaminants du kaddid, l'identification du genre de deux (2) souches sélectionnées a montré la présence *Cryptococcus* (S_3J_0) et *Penicilium* (S_4J_{15}), ces souches indicatrices sont utilisées pour caractériser l'activité antifongique des isolats lactiques.

Les résultats de l'activité antifongique, nous a permis de sélectionner 23 souches lactique ayant une activité antifongique modérée avec la méthode de contacte directe, dont trois (3) souches leurs surnageants natifs possèdent une activité importante, *Lactobacillus* (S_3J_3) et *Leuconostoc* (S_1J_3), ainsi que la souche *Enterococcus* (S_6J_0) a montré une activité a la fois antimoisissure et antilevure.

L'activité antifongique des surnageants neutralisés et traités avec la catalase nous a permis d'identifier les inhibiteurs majeurs qui sont particulièrement, les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et/ou d'autres substances.

Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives. Pour compléter ce travail, nous proposons :

- Etudier d'autres paramètre physicochimique (taux de cendre, teneur en sels, teneur en protéine, teneur en matière grasse, etc. ;
- Compléter la description de la diversité microbienne dans le kaddid par l'utilisation des techniques moléculaires pour une meilleure précision et signification de la microflore présente dans le kaddid, et continuer la recherche sur la flore d'intérêt technologique non seulement la flore lactique ;
- D'une purification et caractérisation des inhibiteurs antifongiques majeurs des souches performantes, et l'étude des conditions de synthèse de ces métabolites.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

Albano H., Todorov S.D., Van Reenen C.A., Hogg T., Dicks L.M.T and Teixeira P., 2007. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from "Alheira", a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*. **116**: 239-247.

Alexandre H., Grandvalet C., Guilloux-Benatier M., Remize-Barnavon F and Tourdot-Maréchal R., 2008. Les bacteries lactiques en oenologie. *Lavoisier*, Paris. 160-173.

Ammor M.S and Mayo B., 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*. **76**: 138-146.

Ammor M. S., Gueimonde M., Danielsen M., Zagorec M., Van Hoek A. H and de LosReyes-Gavilán C.G et *al*., 2008. Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmidcarried *tet* (L) and chromosomally-encoded transposon associated *tet* (M), coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. *Applied Environmental Microbiology* (Epub ahead of print). *Journal of Antimicrobial Agents*. **16**: S19-S24.

Ammor, M.S., Mayo, B., 2007 Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. Meat Science, 76, 138–146.

Ammor S., Dufoura E., Zagorecb M., Chailloub S and Chevalliera I., 2005 b. Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology*. **22**: 529-538.

Ammor S., Rachman C., Chaillou S., Prévost H., Dousset X., Zagorec M., Dufour E and Chevallier I., 2005a. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*. **22**: 373 382.

Ammor S., Tauveron G., Dufour R and Chevallier I., 2006. Antibacterial activity of lactic acide bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat smallscale facility. 1-Screening and charavterization of antibacterial compounds. *Food Control*. **17**: 454-461.

Andrés A., Barat J.M., Grau A and Fito P., 2007. Principles of Drying and Smoking. Meat Fermentation Worldwide: History and Principles. *In*: Handbook of Fermented Meat and Poultry. *Blackwell Publishing*. **1(5)**: 37-46.

Axelsson L., 2004. Classification and physiology. *Chapter 1*. *In:* Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3rd Ed. *Marcel Dekker, Inc.* New York. 1-66.

Babić I., Markov K., Kovačević D., Trontel A., Slavica A., Đugum J., Čvek D., Svetec I. K., Posavec S and Frece J., 2011. Identification and characterization of potential autochthonous starter cultures from a Croatian “brand” product “Slavonski kulen”. *Meat Science*. **88(3)**: 517-524.

Baliarda A., 2003. Évaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* approches physiologiques et génétiques. Thèse de Doctorat. Spécialité : Sciences des Aliments et Nutrition. Université Bordeaux 1. 394 p.

Barrangou R., Lahtinen S.J., Ibrahim F and Ouwehand A.C., 2012. Genus *Lactobacillus*. *Chapter 5. In*: Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 4 th ED. *Taylor & Francis Group*.124-139.

Bayrock D.P,Ingledew W.M.,2004,Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continous culture:nutrient depletion and /or acid toxicity?,Journal of indistrual microbiology and biotechnology,31,362-368.

Ben Belgacem Z., Dousset X., Prévost H and Manai M., 2009. Polyphasic taxonomic studies of lactic acid bacteria associated with Tunisian fermented meat based on the heterogeneity of the 16S–23S rRNA gene intergenic spacer region. *Archive Microbiol*. **191**: 711-720.

Bennani L., Faid M and Bouseta A., 2000. Experimental manufacturing of kaddid, a salted dried meat product: Control of the microorganisms. *European Food Research and Technology*. **211(3)**: 153-157.

Bennani L., Zenati Y., Faid M and Ettayebi M., 1995. Physico-chimical and micobiological characteristics of a dried salted meat product (Kaddid) in Morocco. *Z Lebensm Unters Forsch*. **201**: 528-532.

Bonestroo, M. H., Dewit, J. C., Kusters, B. J. M., Rombouts, F. M., 1993 Inhibition of the growth of yeasts in fermented salads. International Journal of Food Microbiology, 17,311–320.

Boubakri kamel ., 2015: Aptitude à la bioconservation de quelques produits alimentaires par des bactéries lactiques locales : étude sur une gamme de matrices alimentaires.

Bourgeois, C. M., Larpent, J.P., 1996. Aliments fermentés et fermentation alimentaire, Microbiologie alimentaires. Tome 2. Edition © Technique Documentation Lavoisier,Paris.

Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P., 1990. Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, *Ed. Masson*, Paris, 512p.

Brul, S., Coote, P., 1999 Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. International Journal of Food Microbiology, 50, 1–17.

Budde B.B., Hornbæk T., Jacobsen T., Barkholt V and Koch A.G., 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats, culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology*. **83**: 171-184.

Buzzini P., Rossi J., Geranio N., Tozzi, G., & Morosi, A., 1994. Fermented sausages produced in Umbria (Italy): chemical, microbiological and sanitary characteristics. Microbiolgie Aliments Nutrition, 12, 225–266.

Carr F.J., Chill D and Media N., 2002. The lactic Acid Bacteria: A Literature Survey.*Critical Rev. Microbiol*. **28(4)**: 281-370.

Casaburi A., Aristoy M.C., Cavella S., Di Monaco R., Ercolini D., Toldrá F and Villani F., 2007. Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science*. **76**: 295-307.

Casaburi A., Blaiotta G., Mauriello G., Pepe O and Villani F., 2005. Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. *Meat Science*. **71**: 643-650.

Castegnaro M**. Pfohl-Leszkowicz** A**.** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans La sécurité alimentaire du consommateur, Lavoisier, Tec &Doc 2002.

Castro M.P., Palavecino N.Z., Herman C., Garro O.A and Campos C.A., 2011. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*. **87**: 321-329.

Collins E.B,Hardt P.,1980,inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*, Journal of Dairy science,63,830-832.

Crowley S., Mahony J and van Sinderen D., 2012. Broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacteria and their application in fruit models. *Folia Microbiol*. DOI 10.1007/s12223-012-0209-3.

Dalié D.K.D., 2010, Bicontrole des moisissures du genre *Fusarium* productrice de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtone de mais,Thése doctorat,université Bordeaux **I.**

Daoudi A, Frentz J.C., Martin J.L. & Mekhtiche L., 2006. Les produits charcuteries halal: Charcuterie et preparations boucheres. Conflandey:MAE-ERTI. p 492**.**

Davidson, M. P. (2001). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, T. J. Montville (Eds.), Food microbiology: Fundamentals and frontiers (pp. 593–627). Washington: ASM pressDe Castro, R.D., Marraccini, P. (2006) Cytology, biochemistry and molecular changes duringcoffee fruit development. Brazilian Journal Plant Physiology. 18: 175-199.

Davis Larone, H., 1987. Medically important fungi. A guide to identification. 2nd edition Elsevier, London, 230 p.

Debbouz A, **Donnelly** B.J**.** Process effect on couscous quality. Engineering andprocessing. Cereal chem. Vol. 73. 1996 p668-671.

Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C., Janssens, D., 1994. Aractéristiques générales des bactéries lactiques. In Bactéries Lactiques, pp. 25–116. Edited by H. de Roissart & F. M. Luquet. Paris : Lavoisier.

De Man, J.C., Rogosa, M., Elisabeth Sharpe, M., 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J Appl Bacteriol*, 23(1) : 130–135.

Djossou O,Perraud-Gaime I, Lakhal Mirleau F, Rodriguez-Serrano G, Karou G, Niamke S,Ouzari I, Boudabous A, Roussos S.,2011, Robusta cofee beans post harvest microflora:*Lactobacillus plantarum* sp.As potential antagonist *of Aspergillus carbonarius*, Anareobe,17,267-272.

Dortu, C., 2008. Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. These de doctorat en Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique. Universite de Gembloux, Belgique. 131 p.

Drosinos E.H., Mataragas M and Paramithiotis S., 2008. Antimicrobial Activity of Bacteriocins and Their Applications. *Chapter 17. Meat Biotechnology.* F. Toldrá (Ed.). 375 - 391.

Drosinos E. H., Mataragas M., Xiraphi N., Moschonas G., Gaitis F and Metaxopoulos J., 2005. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*. **69**: 307-317.

Drosinos E.H., Paramithiotis S., Kolovos G., Tsikouras I and Metaxopoulos I., 2007. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and *staphylococci* isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*. **24**: 260-270.

Duniere L., 2012. Stratégies de limitation du portage sain des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) par les bovins. Potentiel bio-protecteur des bactéries lactiques en alimentation animale**.** Thèse de doctorat**.** Université Blaise Pascal.

Endo A and Okada S., 2005. Monitoring the lactic acid bacterial diversity during *shochu* fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **99**: 216-221.

Endo A and Okada S., 2006. *Oenococcus kitaharae* sp. Nov, a non-acidophilic and nonmalolactic-fermenting *oenococcus* isolated from a composting distilled shochu residue. *Int J System Evol Microbiol*. **56**: 2345-2348.

Essid I and Hassouna M., 2013. Effect of inoculation of selected *Staphylococcus xylosus* and *Lactobacillus plantarum* strains on biochemical, microbiological and textural characteristics of a Tunisian dry fermented sausage. *Food Control*. **32**: 707-714.

Euzéby J.P., 2011. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Lactobacillus*. Available at : http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html [Consulté 23 novembre, 2013].

Filtenborg, O., Frisvad, J. C., Thrane, U., **1996** Moulds in foodspoilage. International Journal of Food Microbiology, 33, 85–102.

Franz C.M.A.P., Stiles M.E., Schleifer K.H and Holzapfel W.H., 2003. *Enterococci* in foods - a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology Enterococci in Foods*. *Functional and Safety Aspects*. **88**: 105-122.

Gerez C.L, Torres M,J Font de Valdez G, Rollàn G.,2012 Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. Biological Control, 64, 231-237.

Gobbetti M., De Angelis M., Corsetti A and Di Cagno R., 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Tech*. **16**: 57-69.

Gould G.W.,2000, Préservation:past,present and future,British Medical Bulletin,56,84-96.

Guillo N.,1958,Elaboration par *Lactobacillus acidophilus* d'un produit actif contre *Candida albicans*,annales de l'institut pasteur,95,194-207.

Guiraud J.P., 2003. Microbiologie Alimentaire. *Tec & Doc, Dunod.* Paris. 90-696.

Gupta R, Srivastava., 2014, Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage, Food Microbiology,42, 1-7.

Hadef S., 2012 : Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques Des bactéries lactiques locales.

Haris C introduction to modern microbiologie black wall scientific publication.1989 179p.

Hassaine Omar ., 2013 caractéristiques d'intérêts technologiques de souches de bactéries lactiques isolées de lait camelin du sud algérien.

Herrerosa M.A., Sandovalb H., González L., Castrob J.M., Fresnoa J.M and Tornadijoa M.E., 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *Food microbiology*. **22**: 455-459.

Hofvendahl K and Hahn-Hägerdal., 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzymes Microbial Technol*. **26**: 87-107.

Ho P.H., Luo J. B and Adams M. C., 2009. Lactobacilli and Dairy Propionibacterium with Potential as Biopreservatives against Food Fungi and Yeast Contamination. *AppliedBiochemistry and Microbiology*. **45**(4): 414-418.

Hongjuan L., Lu L., Shuwen Z.h., Wenming C and Jiaping L., 2012. Identification of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Current Microbiol*. **65**: 156-161.

Ho T.N.T., Tuan N.N., Deschamps A and 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.

Hugas M., Garriga M., Aymerich M.T., 2003. Functionality of *Enterococci* in meat products. *International Journal of Food Microbiol*. **88**: 223-233.

Huys G., Leisner J and Björkroth J., 2012. The Lesser LAB Gods: *Pediococcus,Leuconostoc, Weissella, Carnobacterium,* and Affiliated Genra. *Chapter 6. In*: Lactic AcidBacteria. Microbiological and Functional Aspects. 4 th ED. *Taylor & Francis Group*.124-139.

Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E and Karam N.E., 2009. Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas Y Aceites*. **60(2)**: 177-183.

Igene J.O. & Abulu, E., 1984. Chemical and bacteriological characteristics of Tsire-type Suya meat products. Journal of the Science of Food and Agriculture 37, 818–824.

Jay J.M., Loessner M.J and Golden D.A., 2000. Modern food microbiology. Food science text series. *Spinger Science & Buniss Media,* Inc. 6 th ED. 637.

Jefca, (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2001) Safety Evaluation of Certains Mycotoxins in Food, WHO Food Additives Series 47, FAO Food and Nutrition Paper 74, WHO, Geneva, Switzerland, p. 366.

Joffraud J.-J., Cardinal M and Cornet J., 2006. Effect of bacterial interactions on thespoilage of coldsmoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*. **112**: 51-61.

Jones R.J., 2004. Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populationsin chill-stored vacuumpackaged beef. *International Journal of Food Microbiology*. **90**: 273-282.

Koort J., Coenye T and Santos E.M., 2006. Diversity of *Weissella viridescens* strainsassociated with "Morcilla de Burgos". *International Journal of Food Microbiology*. **109**: 164-168.

König H and Fröhlich J., 2009. Lactic Acid Bacteria. *Chapter 1*. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 3-5.

Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel, W.H., Franz, C.M., 2005. Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Syst Appl Microbiol*, 28(6): 527–540.

Kouete Kongni V., 2012. Étude de la qualité microbiologique des viandes boucanées de boeuf vendues dans la ville de Yaounde. Memoire presente en vue de l'obtention du Diplôme de Professeur de l'Enseignement. Universite de Yaounde I.

Krieg, N.R. Garrity, G. M., Boone D. R., Castenholz, R. W. Williams and Wilkins, Baltimore., 2001, The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria - Identification of procaryotes. In Bergey's Manual of systematic Bacteriology. 721: 33–38.

Landeta G., Curiel J.A., Carrascosa A.V., Muñoz R and de las Rivas B., 2013. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Science*. **95**: 272-280.

Larpent, J.P., Larpent-Gourgand, M., 1997. Mémento technique de microbiologie. 3ème Edition, Tech & doc., Lavoisier. 1039p.

Larpent, J.-P., Larpent-Gourgaud, M., 1985. Éléments de Microbiologie. Hermann. Paris. 264 p.

Larpent, J.P., Sanglier, J.J., 1989. Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson. Paris, 481p.

Lavermicocca P., Valerio F and Visconti A., 2003. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied Environment and Microbiol*. **69(1)**:634-640.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobetti, M. **,2000** Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. Applied and Environmental Microbiology, 66, 4084–4090.

Le Bars J, **Le Bars** P**.** Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Conférence « section Midi- Pyrénées » cf.bulletin de l'association des anciens élèves de l'institut pasteur, 4eme trimestre.198.

Lepoivre, Ph., 2003. Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte, pp.111-140.

Leroi F., Joffraud J.J., Chevalier F and Cardinal M., 2001. Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters. *Journal of Applied Microbiol*. **90**: 578-587.

Leroy F and De Vuyst L., 2009. Fermentation and Acidification Ingredients. *Chapter 11*. Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications. R. Tarté (ed.). Springer Science + Business Media. 227-242.

Leroy F., Verluyten J and De Vuyst L., 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. **106**: 270-285.

Leroy S., Lebert I., Chacornac J.P., Chevalier I and Talon R., 2007. Identification et caracterisation de la flore d'interet technologique : bactéries lactiques et staphylocoques à coagulase négative. *Sciences et Techniques des Viandes et des Produits Carnés*. **25(5)**: 165-172.

Lindgren, S. E., Dobrogosz,W. J., **1990** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiology Reviews, 87, 149–164.

Lorenzo J.M., García Fontán M.C., Cachaldora A., Franco I and Carballo J., 2010. Study of the lactic acid bacteria throughout the manufacture of dry-cured lacón (a Spanish traditional meat product). Effect of some additives. *Food Microbiology*. **27**: 229-235.

Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Sjogren, J. & Schnurer, J., 2003. Broad and complexantifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **219**, 129-135.

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.

Marth.E.H,Hussong R.V.,1963, Effect of skim milks cultured with different strains of *Leuconostoc citrovorum* on groth of some bacteria and yeast,46,1033-1037**.**

Marty E., Buchs J., Eugster-Meier E., Lacroix C and Meile L., 2012. Identification of *staphylococci* and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR-RFLP. *Food Microbiology*. **29**: 157-166.

Masuda S., Yamaguchi H., Kuroka W.A.T., Shirakami T., Tsuji R.F and Nishimura I., 2008. Immunomodulatory effect of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from soy sauce moromi grown in high-salt medium. *International Journal of Food Microbiology*. **121**: 245-252.

Morin O., 1994 *Aspergillu*s et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir.(Elsevier, Paris), *Maladies infectieuses* 8-600-A-10 1994.

Nasraoui, B., 2006. Les champignons parasites des plantes cultivées, biologie, systématique, pathologie, maladies.

Ndagano D, Lamoureux T, Dortu C, Vandermoten S, Thonart P.,2011 Antifungal activity of two lactic acid bacteria of the *Weissella* genus isolated from food. *J Food Sci* **76**: 305-311.

Ndagano D., 2011, Etude de l'activité antifongique des bactéries lactiques isolées de produits alimentaires fermentés et caractérisation de leurs métabolites inhibiteurs, ph.D, Thèse, Université de Liége.

NF : V 08-010 Mars 1996. Microbiologie des aliments-Règles générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique ; Analyse microbiologique tome 1 ; *Méthodes horizontales*. AFNOR 6e ED. 67-75.

Nielsen, D.S., Jacobsen, T., Jespersen, L., Koch, A.G., Arneborg, N., 2008. Occurrence andgrowth of yeasts in processed meat products - Implications for potential spoilage. *Meat Sci*, 80(3): 9 19–926.

Nielsen, P. V., de Boer, E., **2000** Food preservatives against fungi. In R. A. Samson, E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad, & O. Filtenborg (Eds.), Introduction to food- and airborne fungi (pp. 357–363). Utrecht: Centraal Bureau voorSchimmelcultures.

Niku-Paavola, M., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., Haikara, A., **1999** New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. Journal of AppliedMicrobiology, 86, 29–35.

Nissen-Meyer J,Oppega°rd C, Haugen H,S Kristiansen P.E., 2010, structure and mode-of-action of the two-peptide (Class-IIb) Bacteriocins, Probiotic & Antimicrobial Proteins, 2,52-60.

Nissen-Meyer J, Rogne P, Oppegàrd C, Haugen H.S, Kristiansen P.E., 2009, structure-function Relationship of the Non-Lanthionine-Containing Peptide (class II) Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria, Current Pharmaceutical Biotechnology, 10. 19-37.

Olga, D. (2011). Mycoflore post-récolte du café robusta et utilisation des bactéries lactiques pour le contrôle des moisissures mycotoxinogènes et de l'Ochratoxine A p. 17-38.

Oki K., Kumar Rai A., Sato S., Watanabe K and Tamang J.P., 2011. Lactic acid bacteria isolated from ethnic preserved meat products of the Western Himalayas. *Food* Microbiology. **28**: 1308-1315.

Orla-Jensen, S., 1919. The Lactic Acid Bacteria. Copenhagen: Host and Son.

Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M., Swings, J., 2005. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiol Lett*, 251(2): 267–271.

Ouadghiri, M. (2009). Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés «Lben » et « Jben » d'origine marocaine. Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohammed V-Agdal. Maroc. 132 p.

Pearson A.M and Young R. B., 1989. Composition and structure of skeletal muscle.pages 235-265. *In:* Muscle and meat biochemistry. Academic Press, Inc, London, UK.

Peirson M.D., Guan T.Y and Holley R.A., 2003. *Aerococci* and carnobacteria cause discoloration in cooked cured bologna. *Food Microbiology*. 149-158.

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.

Pidcock K., Heard G.M and Henriksson A., 2002. Application of non-traditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *International Journal of Food Microbiology*. **76**: 75-81.

Pilet M.F., Magras C and Federigh M., 2005. Bactéries lactiques. *In :* bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2ndEd. *Economica*. Paris. 219-240.

Piper P, Calderon CO, Hatzixanthis K & Mollapour M., 2001 Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology* **147**: 2635-2642.

Prema P., Smila D., Palavesam A and Immanuel G., 2010. Production andCharacterization of an Antifungal Compound (3-Phenyllactic Acid) Produced by *Lactobacillus plantarum* Strain. *Food Bioprocess Technol*. **3**: 379-386.

Renouf V., Claisse O and Lonvaud-Funel A., 2006. rpoB gene, A target for identification of LAB cocci by PCRDGGE and melting curves analyses in real time PCR. *Journal ofMicrobiological Methods*.**67**: 162-170.

De Roissart, H., Luquet, F.M., 1994. Les bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France, vol.1. pp. 1-286.

Roquebert M.F. Les moissures : nature, biologie et contamination. Paris1997 online http://www.forumlabo.Culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/roqueber.htm.

Ruiz-ramirez J., Serra X., Arnau J and Gou P., 2005. Profiles of water content, water activity and texture in crusted dry-cured loin and in non-crusted dry-cured loin. *Meat Science*. **69**: 519-525.

Sachindra, N.M., Sakhare, P.Z., Yashoda, K.P., Narasimha Rao, D., 2005. Microbial profile of buffalo sausage during processing and storage. *Food Control*, 16(1): 31–35.

Sadler G.D and Murphy P.A., 2010. pH and titratable acidity. Chapter: 13. *In*: Nielsen SS (ed) Food analysis. 4th ED. Springer, New York. 221-237.

Salvetti E., Torriani S and Felis G.E., 2012. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics & Antimicro. Prot. Springer Science*. **4**: 217-226.

Schneider R., Fernandez F.J., Aguilar M.B., Guerrero-Legarret A.I., Alpuche-Solis Aand Ponce-Alquicira E., 2006. Partial characterization of a class IIa pediocin produced by*Pediococcus parvulus* 133 strain isolated from meat (Mexican "chorizo"). *Food Control*. **17**: 909-915.

Sjögren J, Magnusson J, Broberg A, Schnurer J, Kenne L., 2003 Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7554-7557.
Smit G, Smit B.A and Engels J.M., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of chese products. FEMS Microbiol Revue. 29: 591-610.
Stiles J,Penkar S,Plockova M,Chumchalova J,Bullerman L.B.,2002,Antifungul activity of sodium acétate and *Lactobacillus rhamnosus*,Journal of Food protection,65,1188-1191.
Stroim, K., Sjo¨gren, J., Broberg, A., Schnurer, J., **2002** *Lactobacillus plantarum*MiLAB393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and phenyl lactic acid. Applied and Environmental Microbiology, 68, 4322–4327.*Systematic Bacteriology*, **39**, pp: 279-283.
Tabuc C., Bailly J.D., Bailly S., Querin A and Guerre P., 2004. Toxigenic potential of fungal mycoflora isolated from dry cured meat products: preliminary study. *Revue. Méditéranienne Vétérinaire*. **156**: 287-291.
Tagg J.R., Wescombe P.A and Burton J.P., 2012. *Streptococcus*: A brief Update on the Current Taxonomic Status of the Genus. *Chapter 7. In:* Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 4 th ED. *Taylor & Francis Group*.124-139.
Talon R., Leroy S and Lebert I., 2007. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. *Meat Science*. **77**: 55-62.
Talon R., Leroy S., Lebert I., Giammarinaro P., Chacornac J. P and Latorre-Moratalla M., 2008. Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*. **126**: 227-234.
Tamime A.Y., 2002. Microbiology of starter cultures. *In:* Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). *3rd Ed. John Wiley and Sons, Inc.* New York. 261-366.
Tanasupawat S., Shida O., Okada S and Komagata K., 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. Nov. and *Weissella thailandensis* sp. Nov, isolated from fermented fish in Thailand. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**: 1479-1485.
Thompson J.K, M.A Collins. et W.D. Mercer., 1994 Characterisation of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus CNRZ 450*. J. Appl. Bacteriol, 80 338–348.
Tosukhowong A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D and Sonomoto K., 2005. Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **99**: 30-37.
Von Wright A and Axelsson L., 2012. Lactic Acid Bacteria: An Introduction. *Chapter 1*. *In*:Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. (Lahtinen S; Ouwehand A.C;Salminen S; Von Wright A) 4 th Ed. *Taylor & Francis Group*. 2-14.
Wang F.S., 2000. Effects of three preservative agents on the shelf life of vacuum packaged Chinese-style sausage stored at 20°C. *Meat Science*. **56**: 67-71.
Whitesel T., 2011. Moroccan finger foods. Available at: http://www.ehow.com/list_ 6087503_moroccan-finger-foods.html (consulté: 12-09-2013).
Wilson, K.A., Kalkum, M., Ottesen, J., Yuzenkova, J., Chait, B., Landick, R., Muir, T.,Severinov, K., Darst, S., 2003. Structure of microcin J25, a peptide inhibitor ofbacterial RNA polymerase, is a lassoed tail. *J Am Chem Soc*, 125(41): 12475–12483.**Welman, A.D.,**

Maddox, I.S., 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria,perspectives and challenges. *Trends Biotechnol,* 21(6): 269–274.

Wiseman D.W.Marth E.H., 1981, Groth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis*,Mycopathologia,73,49-56.

Yaakoubi K., Benkerroum N., Wiorowski F., Sanson F., Haydersah J and Chevallier I., 2009. Development of a multiwell antagonistic activity assay for the detection of bacteriocin production by lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*.**17**: 32-45.

Zaier A., Essid I., Chabbouh M., Bellagha S and Sahli A., 2011. Physico-chemical and microbial caracteristics of traditional and industrial kaddid. *European Drying Conference – Euro Drying'*2011. Palma. Balearic Island, Spain, 26-28 October 2011.

Zillinksy, F .J., 1983. Maladies communes des céréales à paille. Guide d'identification.

Annexe

Annexe I
Composition des milieux de culture, réactifs et tampons

TSE (Tryptone-sel-eau)

Tryptone 1 g
Chlorure de sodium 8,5 g
Eau distillée qsp 1000 ml
pH7,4. Stériliser par autoclavage 120°C
Pendant 15min.

Eau peptonée tamponnée (EPT)
Peptone 20 g
Chlorure de sodium 5 g
Phosphate disodique 9 g
Phosphate monopotassique 1,5 g
Eau distillée qsp 1000 ml
PH 7,2. Stériliser par autoclavage
120°C pendant 15min.

Eau physiologique
Chlorure de sodium 8,5g
Eau distillée qsp 1000ml
pH 7. Stériliser par autoclavage
120°C pendant 15min.

Lait écrémé stérile reconstitué à 10%
Poudre de lait (0% MG) 100g
Eau distillée qsp 1000.
pH6, 5. Stérilisation par tyndallisation, 3fois pendant 30min à
100°C.

- **Les milieux gélosés**

PDA (*potato dextrose agar*)
Extrait de pomme de terre (à partir de 200g)
1L
Glucose 20g
Agar 15
pH 5,6. Stériliser par autoclavage
120°C pendant 15min.

Gélose MRS
Peptone 10 g
Extrait de viande 10 g
Extrait de levure 5 g
Glucose 20 g
Tween 80 1 ml
Phosphate dipotassique 2 g
Acétate de sodium 5 g
Citrate triammonium 2 g
Sulfate de magnésium 0,20 g
Sulfate de manganèse 0,05 g
Eau distillée qsp 1000 ml
PH 6,2. Stériliser par autoclavage
120°C pendant 15min.

Milieu Gibson-Abdelmalek
Extrait de levure 2.5g
Glucose 50g
Jus de tomate 100ml
Lait 800ml
Gélose nutritive ordinaire 200ml
pH6, 5. Stérilisation par tyndallisation, 3fois pendant 30min à 100°C.

Gélose blanche
Agar 15g
Eau distillée qsp 1000ml
pH 7. Stériliser par autoclavage
120°C pendant 15min.

- **Les réactifs et tampons**

Fuschine de Ziehl
Fuschine basique 1g
Alcool éthylique à 90° 10ml
Phénol 5g
Eau distillée qsp 100ml
La solution est diluée au 1/15.
Bleu de méthylène (coloration vitale)
Bleu de méthylène 0,2g
Eau distillée qsp 1000mL.
Tampon PBS (0,1M/ L, pH 7,2)
Na_2HPO4 10.9g
Na_2H2PO4 3.2g
NaCl 90g
Eau distillée qsp 1000ml
Stériliser par autoclavage 120°C pendant 15min. Diluer 1/10 dans l'eau

distillee avant l'utilisation.

Cristal violet
Solution A
Cristal violet 2g
Alcool à 95° 20ml
Solution B
Oxalate de NH4 0,8g
Eau distillée qsp 20ml

Mélanger les solutions A et B.

Lugol
Iode 1g
Iodure de potassium 2g
Eau distillée qsp 300ml.

Catalase (réactif pour la mise en évidence)
Eau oxygénée 10 volumes (10%).

Annexe II

Coloration de Gram
1- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes
4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
6- Laver a l'eau distillée pendant 5 secondes
7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte a goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
8- Laver a l'eau distillée pendant 5 secondes
9- Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes
10- Laver a l'eau distillée pendant 10 secondes
11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement. Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

Annexe III

Tableau 1. Dénombrement de la flore lactique et la flore fongique.

Flore dénombré et recherché		**Jour 0**	**Jour 3**	**Jour7**	**Jour15**
Flore lactique		5.909*10 UFC/g	34.318*10 UFC/g	17.272*10 UFC/g	5.909*10 UFC/g
Flore fongique	**PDA**	15	11.5	10	19.318
Flore fongique	**OGA**	27.272	17.5	12.727	0

Tableau2. Les valeurs des analyses des paramètres physicochimiques

Les jours	Jour0	Jour3	Jour7	Jour15
pH	5.15	5.58	5.18	5.65
H %	58	21	6	1.5
Te %	65	26	7	2
MS %	35	74	93	98
Aw	0.85	0.4	0.3	0.17
Acidité %	0.4	1.6	2	2.2