



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

**FACULTE : SCIENCES
DEPARTEMENT : BIOLOGIE**

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par :

NASRI Lynda & ELKHELLAL Nacira

DOMAINE : Science de la Nature et de la Vie (S.N.V)

FILIERE : Biologie

OPTION : Microbiologie Environnementale et Infectieuse

Thème

Extraction et quantification de l'ADN métagénomique de la viande hachée commercialisée dans la ville de Laghouat

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
Membre 1		Président
Membre 2		Examineur
ZIANE Mohammed	Maître de Conférences A	Rapporteur
ZHAKHROUF FZ	Maître-Assistant A	Co-rapporteur

Promotion : juin – 2017



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



جامعة عمار ثليجي - الأغواط

كلية: العلوم

قسم: البيولوجيا

مذكرة ماستر

تقديم الطالب (ة):

ناصرى ليندة & الخلال نصيرة

ميدان: علوم الطبيعة و الحياة

شعبة : البيولوجيا

تخصص: علم الاحياء الدقيقة البيئية والامراض المعدية

موضوع البحث

استخلاص و تقدير كمية الحمض النووي الميتاجينومي في اللحوم
المطحونة المسوّقة في مدينة الأغواط

أعضاء لجنة المناقشة:

الاسم و اللقب	الدرجة العلمية	الصفة
عضو 1		رئيسا
عضو 2		ممتحن أول
زيان محمد	أستاذ محاضر درجة أ	مقررا
زخروف فاطمة الزهراء	أستاذ مساعد درجة أ	مقررا مساعدا

الدفعة: جوان- 2017

Remerciements	i
Dédicaces	i
Liste des abréviations	ii
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	ii

INTRODUCTION	1
---------------------	----------

CHAPITRE I

Généralités sur la viande

I. 1. Définition	2
I. 2. Classification de la viande	2
I. 3. Rappel de la constitution du muscle	2
<i>I. 3. 1. Tissu conjonctif</i>	3
<i>I. 3. 2. Fibres musculaires</i>	3
I. 4. Valeur nutritionnelle de la viande	4
I. 5. Transformation des muscles en viande	6
I. 6. Transformation de viande en viande hachée	6
<i>I. 6. 1. Composition des viandes hachées</i>	6
<i>I. 6. 2. Opération d'hachage et l'hygiène des viandes</i>	6

CHAPITRE II

Microbiologie de la viande

II. 1. Hygiène des viandes hachée	8
<i>II. 1. 1. Contamination avant l'abattage</i>	8
<i>II. 1. 2. Contamination après l'abattage</i>	8
II. 2. Germes contaminants des viandes de boucherie	8
<i>II. 2. 1. Germes saprophytes et indicateurs d'hygiène</i>	9
<i>II. 2. 2. Germes pathogènes</i>	9
<i>II. 2. 3. Origine de contamination</i>	9
<i>II. 2. 4. Toxi-infection liée à la consommation de la viande</i>	11
II. 3. Critères microbiologiques de la viande hachée	12
II. 4. Prévention contre les agents microbiens dans la viande hachée	12
II. 5. Micro-organismes non cultivable	13

Chapitre III

Généralités sur la métagénomique

III. 1. Généralité sur la métagénomique	14
III. 2. Différentes types de métagénomique	14
III. 3. Objectif de la métagénomique	15

III. 4. Réalisation de l'étude métagénomique	15
<i>III. 4. 1. Collecte d'échantillons biologiques</i>	15
<i>III. 4. 2. Acquisition des données : génotype, séquençage complets : durant cette étape</i>	15
<i>III. 4. 3. Organisation des données sous forme de bases de données et leur analyse statistique informatique et bio-informatique</i>	16
<i>III. 4. 4. Domaine d'application de la métagénomique</i>	16
<i>III. 4. 4. 1. L'apport en biodiversité</i>	16
<i>III. 4. 4. 2. L'apport en taxonomie et évolution</i>	16
<i>III. 4. 4. 3. L'apport en métabolisme</i>	16

IV. Matériel et méthodes

IV. 1. Echantillonnage et prélèvement de la viande hachée	19
IV. 2. Transport des échantillons au laboratoire	19
IV. 3. Recherche et dénombrement de la flore totale mésophile	20
IV. 4. Construction de la banque d'ADN métagénomique	20
IV. 5. Confirmation par électrophorèse d'agarose	21

V. Résultats et discussion

V. 1. Dénombrement de la flore totale mésophile	23
V. 2. Obtention de l'ADN métagénomique de la viande hachée	24
V. 3. Estimation de la quantité d'ADN métagénomique	26

CONCLUSION	26
-------------------	-----------

Références bibliographiques	29
------------------------------------	-----------

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier le bon Dieu tout puissant de nous avoir aidé à achever ce travail.

En premier lieu nous remercions vivement notre promoteur M. Mohammed ZIANE, maître de conférences classe A, du centre universitaire de Ain Témouchent, qui a su, à sa façon, de nous conseiller et de nous orienter pendant toute la durée de la réalisation de ce travail. Merci pour votre disponibilité et de la confiance que vous nous avez accordé en nous laissant une impressionnante liberté de travail et de décision. Ça fait un grand plaisir de travailler avec vous !

Nous tenons également à remercier les membres de jury qui ont accepté d'enrichir et examiner ce modeste travail !

Nous tenons également à exprimer nos plus vifs remerciements à tous nos enseignants de département de Biologie et toutes personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail surtout l'équipe de laboratoire de biochimie de la faculté de médecine ainsi que le personnel de laboratoire de recherche de l'université d'Oran.

Nacira & Lynda

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail :

A ceux qui ont attendu ce jour depuis longtemps :

Mes trop chers parents, ce que je dois en retour l'affection et la tendresse, à ceux qui ont contribué à ma réussite tout au long de mes études avec tant de sacrifices ;

A mon cher frère Moussa ;

A ma chère sœur Sonia ;

Que dieu vous garde, sans vous je ne peux être ce que je suis ;

A mon cher Naim ;

A mes grands-parents ;

A mes chers oncles et tantes, et à tous mes cousins ;

*A mes collègues dans toutes les étapes
d'étude ;*

A tous mes amis et spécialement à la plus chère à mon cœur: Nacira

Lynda

DEDICACES

*Tout d'abord, louange à **ALLAH**, Seigneur du monde*

*Paix et salut sur son fidèle Messager **MOHAMMED***

*Mention spéciale à **mon père** et **ma mère**, ce travail est le fruit des sacrifices et des efforts que vous ne cessez de consentir pour la réussite de vos enfants. Vous êtes des exemples de parents que tout enfant souhaiterait avoir. Soyez assurés de mon affection et de mon attachement indéfectible ;*

*A mes frères **MOHAMMED** & **MOKHTAR** et mes sœurs et leurs enfants ;*

*A mes amies **Lynda** ; **Imen** ; **Fadila** ; **Chaïma** ; **Rokaya** et ses enfants ;*

*A mon très cher **Mohammed Amine Hamada** ;*

A mes grands-parents ;

A tous mes oncles et mes tantes et leurs enfants ;

Nacira

Liste des abréviations

ADN	Acide Deoxy-ribo-Nucléique.
ARN	: Acide Ribo-Nucléique.
ARNr 16S	: Le gène 16 S de l'ARN ribosomique.
Kpb	: Kilo paire de base.
ODG	: Organisme de défense et de gestion
DLC	: Date limite de consommation

Liste des figures

Figure 01	: Représentation schématique de l'appareil contractile et des structures membranaires de la cellule musculaire squelettique	3
Figure 02	: Schéma représente la méthode 5 M.	13
Figure 03	: Différentes étapes d'élaboration d'une étude métagénomique	16
Figure 04	: Répartition des sites de prélèvement sur la carte géographique de la ville de Laghouat	19
Figure 05	: Colonies de la flore totale mésophile sur milieu PCA incubé à 30°C pendant 48h	23

Liste des tableaux

Tableau 01	: Composition nutritionnelle de diverses viandes et d'autres aliments pour 100g*	4
Tableau 02	: Composition nutritionnelle détaillé par 100 g de la viande bovine	5
Tableau 03	: Composition des viandes hachées selon l'espèce	6
Tableau 04	: Etapes de fabrication du viande hachée et les bonnes pratiques d'hygiène	7
Tableau 05	: Principaux microorganismes pathogènes et leurs origines dans la viande hachée	11
Tableau 06	: Spécification microbiologique de l'analyse de la viande hachée selon la réglementation algérienne	12
Tableau 07	: Contamination de la viande hachée par flore aérobie totale mésophile (FAMT)	24

INTRODUCTION

La viande est considérée comme première source de protéines animales grâce à sa richesse en acides aminés indispensables (Atika, 2016). Son approvisionnement est assuré grâce à plusieurs types d'élevage bovines et buffles (22,2%), Ovines et caprines (4,6%), suidés 36,3%, Poulets (35,2%) et autres sources 1,7% au niveau mondial (FAO, 2014). L'estimation de la consommation de la viande dans les pays développés est de 76Kg par habitants et par an, cependant que 34Kg par habitant et par an pour les pays en voie de développement dont les volailles sont en premiers rang de la viande consommée (FAO, 2014). La viande bovine est souciee autant l'intérêt de consommateur garce à leur qualité nutritionnelle mais aussi à sa disponibilité et surtout la possibilité de s'approvisionner par une large tranche de population même à faible revenu. En effet, la viande bovine est consommée sous forme de viande hachée vendu éventuellement à de petite quantité selon le budget de l'individu. Par ailleurs, la viande hachée, au sens large, peut être une source important de dangers microbiologiques surtout qu'elle est très manipulée chez la boucherie, parfois dans des conditions d'hygiènes non respectées.

En Algérie, la viande est le deuxième aliment incriminé dans les toxi-infections alimentaires (20%) après la pâtisserie (21%) (DGROA/DQC/SDNPA/2014). En effet, plusieurs pathogènes ont été isolés de la viande et les produits carnés notamment *Listeria monocytogenes* (Hassan et al., 2001), *Staphylococcus aureus* (Kadariya et al., 2014), *Campylobacter* spp. (KRAMER et al., 2000).

D'autres microorganismes échapperont à la détection par les méthodes de microbiologie classiques essentiellement ceux exigeants à savoir *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* (Lechaudee, 2010). De ce fait, des méthodes biologie moléculaires ont été développées dans l'objectif de sa recherche et détection, appelées la métagénomique. Ces méthodes sont couteuses et demandent des produits et de kits spécifiques non disponibles à notre niveau et difficile à acquérir. Pour cela, nous tenterons d'utiliser la méthode d'extraction d'ADN génomique comme a été fait par Gonzalez-de la Cruz et al. (2011). Nous tenterons également de proposer des recommandations pour améliorer la méthode classique peut être facilement utilisée au niveau de nos laboratoires.

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

- La première partie : se résume en une recherche bibliographique portant les généralités sur la viande, la microbiologie de la viande et des généralités sur la métagénomique ;
- La deuxième partie expérimentale: décrite le matériel et les méthodes utilisées et les résultats obtenus.

CHAPITRE I
Généralités sur la viande

I. 1. Définition

Selon le dictionnaire Larousse (2016), le mot viande en latin populaire « vianda », ou bien du bas latin « vivanda », signifie ce qui sert à la vie. Le Codex Alimentarius définit la viande de la manière suivante: «Toutes les parties d'un animal destinées, ou jugées saines et aptes, à la consommation humaine». Elle se compose d'eau, de protéines et d'acides aminés, de sels minéraux, de graisses et d'acides gras, de vitamines et d'autres composants bioactifs, et de petites quantités d'hydrates de carbone (FAO, 2017). Classification des viandes

I. 2. Classification de la viande

La viande peut être classée selon plusieurs critères zoologiques, partie consommable de la viande et sa couleur (Anonyme, 1989). La classification de la viande est diverse et peut être basée :

- a) Sur le groupe zoologique
 - viande de boucherie (bœuf, mouton (agneau), porc – cheval et veau) ;
 - oiseaux de basse-cour ou volailles ;
 - animaux sauvages ou gibier.
- b) Sur les parties consommables de l'animale
 - Chair musculaire (muscle striés, longs, plats)
 - Abats (muscles lisses) ;
 - Issues (partie de l'animal riches en tissu conjonctif), museau, oreilles ;
 - Produits de charcuterie (Préparation à la base de viande et d'abats crues ou cuites).
- c) Sur la couleur
 - Viande rouge : animaux adultes qui ont été saignés après l'abattage. Cette viande doit subir une maturation ;
 - Viande blanche : animaux jeunes et volailles ;
 - Viande noire : gibier qui n'a pas été saigné. Cette viande doit être faisandée pour l'attendrir et développer son fumet.

I. 3. Rappel de la constitution du muscle

Le muscle comprend les fibres musculaires groupées en faisceaux réunis entre eux par du tissu conjonctif qui contient des vaisseaux sanguins et des nerfs (Alais et *al.*, 2008). Il est constitué aussi de tissu lipidique et de myoglobine qui lui confère sa couleur rouge et sert de réserve d'oxygène (Alais et *al.*, 2008).

I. 3. 1. Tissu conjonctif

Le tissu conjonctif du muscle est constitué de deux protéines principales, le collagène et l'élastine. C'est le collagène qui maintient en place les fibres musculaires. De par sa structure, on comprend pourquoi le collagène est rigide et présente une certaine résistance à la mastication. Ces propriétés augmentent avec l'âge de l'animal c'est pourquoi la dureté d'une viande ne dépend pas seulement de sa teneur en collagène mais aussi de l'âge de l'animal. Les fibres d'élastine sont filamenteuses (Anonyme, 1989).

I. 3. 2. Fibres musculaires

Une fibre musculaire est constituée de très nombreuses myofibrilles parallèles enrobées dans un cytoplasme (sarcoplasme), elle est entourée d'une membrane (sarcolème) qui reçoit le stimulus nerveux et dont la dépolarisation déclenche la contraction.

Chaque myofibrille est enveloppée par un réseau riche en Ca^{++} de réticulum sarcoplasmique et par des tubules qui communiquent avec la sarcolème, les myofibrilles sont composées de 2 filaments parallèles alternativement épais et mince (de myosine et d'actine respectivement), un élément de myofibrille constitue la sarcomère (Alais et *al.*, 2008).

I. 4. Valeur nutritionnelle de la viande

Les viandes recouvrent une multicité d'espèce animales et de morceaux qui se différencient par leurs aspects, leur gout, leur préparation culinaire et leur composition nutritionnelle. Le rapport de FAO (2017) a comparé les différentes compositions différentes types de viande dans le tableau 1.

Tableau 1 : Composition nutritionnelle de diverses viandes et d'autres aliments pour 100g**.

Produit	Eau	Protéine.	Graisse.	Cendres	kJ*
Bœuf (maigre)	75.0	22.3	1.8	1.2	485
Bœuf (carcasse)	54.7	16.5	28.0	0.8	1351
Porc (maigre)	75.1	22.8	1.2	1.0	469
Porc (carcasse)	41.1	11.2	47.0	0.6	1975
Veau (maigre)	76.4	21.3	0.8	1.2	410
Poulet	75.0	22.8	0.9	1.2	439
Gibier (cerf)	75.7	21.4	1.3	1.2	431
Graisse de bœuf (sous-cutanée)	4.0	1.5	94.0	0.1	3573

Graisse de porc (lard dorsal)	7.7	2.9	88.7	0.7	3397
Lait (pasteurisé)	87.6	3.2	3.5		264
Œuf (dur)	74.6	12.1	11.2		661
Pain (seigle)	38.5	6.4	1.0		1000
Pommes de terre (cuites)	78.0	1.9	0.1		301

**Meat processing technology for small- to medium-scale producers (FAO, 2007)

* Kilojoules

En effet, du point de vue nutritionnel, la viande doit son importance à la qualité élevée de ses protéines, qui contiennent tous les acides aminés essentiels, ainsi qu'à ses sels minéraux et vitamines fortement biodisponibles (cf. Tableau 2). Elle est riche en vitamine B12 et en fer, éléments qui ne sont pas directement disponibles dans les régimes végétariens.

I. 5. Transformation des muscles en viande

Après la mort de l'animal, le muscle est le siège de nombreuses transformations qui conditionnent largement les qualités finales de la viande. L'évolution de la viande se fait en trois phases comme décrite par Coibion (2008) :

- phase de pantelante : elle suit directement l'abattage qui se caractérise par une succession de contractions et relaxations musculaires accompagné de la glycogénolyse anaérobie. Par conséquent, l'accumulation d'acide lactique qui s'en suit provoque ainsi une baisse du pH qui passe de 7 à 5,5.
- phase de rigidité cadavérique : L'installation de la rigidité cadavérique (ou rigor mortis) est directement perceptible sur la carcasse : la musculature devient progressivement raide et inextensible dans les heures qui suivent la mort de l'animal. Ce phénomène résulte de l'épuisement du composé qui permet au muscle vivant de conserver son élasticité et qui par ailleurs fournit l'énergie nécessaire au travail musculaire, l'adénosine triphosphate (ATP).
- phase de maturation : Après la rigidité, le muscle va être progressivement dégradé dans une suite de processus complexes au cours desquels s'élaborent en grande partie les divers facteurs qui conditionnent les qualités organoleptiques de la viande et en particulier la tendreté.

I. 6. Transformation de viande en viande hachée

Les viandes hachées sont définies au point 1.13 de l'annexe I du règlement (CE) n° 853/2004. Les viandes hachées sont les viandes désossées qui ont été soumises à une opération d'hachage en fragments et contenant moins de 1% de sel. Néanmoins, pour prétendre à l'appellation 100 % [nom de l'espèce], l'ajout de sel est interdit (GEM-RCM, 2015).

Seules peuvent être utilisées pour la fabrication de viandes hachées les viandes de boucherie des espèces suivantes : bovine, porcine, ovine, caprine et chevaline. Les mélanges de viandes hachées fabriquées à partir de viandes d'espèces différentes restent des viandes hachées au sens du paquet hygiène.

I. 6. 1. Composition des viandes hachées

Les critères de composition sont contrôlés sur la base d'une moyenne journalière (Instruction technique, 2015)

Tableau 3 : Composition des viandes hachées selon l'espèce (UPSV, 2014).

Espèce animale	Tissus adipeux [%]	Rapport tissus conjonctifs sur protéine de viande [%]
Viandes hachées maigres	≤ 15	≤ 12
Pur bœuf haché	≤ 15	
Viandes hachées d'autres espèces (ovines, bovines)	≤ 25	

I. 6. 2. Opération d'hachage et l'hygiène des viandes

Les opérations effectuées, entre la découpe des carcasses et l'obtention de la viande hachée, doivent se dérouler plus en aval pour écourter le délai entre la préparation et la consommation pour minimiser le risque de prolifération microbienne. C'est pourquoi le boucher doit toujours éviter de préparer les viandes à l'avance (Mariam, 2006).

Le tableau 4 décrit les différentes opérations réalisées pour obtenir la viande hachée ainsi que les bonnes pratiques d'hygiène à respecter durant chaque opération.

Tableau 4 : Etapes de fabrication du viande hachée et les bonnes pratiques d'hygiène (CIV; 2012).

Étapes de fabrication de la viande hachée	Bonnes pratiques d'hygiène
Abattoir	
Réception des animaux vivants	Contrôle de l'identification, de l'état de propreté et de la bonne santé de l'animal
Abattage et préparation de la carcasse	Définition et respect des modes opératoires pour éviter la contamination des carcasses (notamment au moment du retrait de la peau et des viscères digestifs) Identification des carcasses qui pourraient avoir été souillées au cours de la préparation pour ne pas les utiliser pour la fabrication des steaks hachés Réalisation de prélèvements à la surface des carcasses pour contrôler leur qualité microbiologique (réglementation européenne)
Conservation / Expédition en atelier de découpe	Refroidissement rapide de la carcasse ($T^{\circ} \leq +7^{\circ}\text{C}$) et respect de la chaîne du froid (en particulier pendant le transport des carcasses)
Atelier de découpe	
Réception / Désossage des carcasses/ Découpe des viandes en cubes /Stockage et expédition	Contrôle visuel à réception Respect de la chaîne du froid après découpe ($T^{\circ} \leq +4^{\circ}\text{C}$)
Atelier de fabrication de la viande hachée	
Réception / Broyage et hachage /Refroidissement / Formage	Réception / Broyage et hachage / Refroidissement / Formage
Conditionnement	Conditionnement
Stockage et expédition / Points de vente (Grandes & moyennes surfaces / Boucheries)	Stockage et expédition / Points de vente (Grandes & moyennes surfaces / Boucheries)

La viande hachée fabriquées à partir de viandes de la chaîneferentes reste des viandes hachées au sens du paquet hygiène. Par ailleurs, lorsque viandes hachées au sens du paquet hygiène la chaines que deurs, lorsque viande produit doit être considérée comme une préparation de viande de volailles. Les critères microbiologiques applicables sont ceux définis pour les préparations de viande de volailles dans le règlement (CE) non de vian (Instruction technique, 2015).

CHAPITRE II

Microbiologie de la viande

II. 1. Hygiène des viandes hachée

La chair des animaux ne renferme pas de microorganismes (Joffin et Joffin, 2010). La présence de microorganismes dans la viande peut avoir plusieurs origines selon les mêmes auteurs :

II. 1. 1. Contamination avant l'abattage

- Par des parasites ne provoquant souvent pas de symptômes (larves de *Taenia saginata* pour la viande de bœuf, de *Taenia solium* pour la viande de porc, larves d'*Echinococcus granulosus* (kystes hydatique), larves de *Trichinella spiralis* (trichine) pour la viande de porc mais aussi de cheval, kystes de toxoplasmes) ;
- Par des microorganismes même si le contrôle vétérinaire permet d'éliminer les animaux malades et si l'éviscération précoce empêche la contamination des muscles par les bactéries du tube digestif ;
- Par l'agent responsable de l'encéphalite spongiforme bovine (ESB), le prion.

II. 1. 2. Contamination après l'abattage

- Contamination par des microorganismes de la peau et/ou de l'intestin ;
- Contamination par les microorganismes se trouvant dans le local d'abattage, de découpe, de stockage et sur le matériel de découpe ainsi que sur le personnel.

Par sa composition, la viande, pauvre en glucides et riche en protéines, est un bon milieu de culture pour les microorganismes protéolytiques (Joffin et Joffin, 2010).

Le hachage et l'attendrissage de la viande sont des transformations favorisant la multiplication des microorganismes parce qu'ils sont alors introduits dans la structure même des tissus (Joffin et Joffin, 2010).

II. 2. Germes contaminants des viandes de boucherie

La microflore de contamination des viandes et des produits à base de viande comprend essentiellement les germes saprophytes et test d'hygiène et éventuellement une flore pathogène responsable des maladies (Mariam, 2006).

II. 2. 1. Germes saprophytes et indicateurs d'hygiène

Les germes saprophytes constituent l'essentiel de la microflore de contamination des viandes et produits à base de viande. Parmi les bactéries saprophytes isolées des viandes, nous pouvons citer par ordre d'importance d'abord *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Micrococcus* ; il y a ensuite : les Entérobactéries et *Flavobacterium* et enfin : *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Lactobacillus*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* et *Clostridium* (Mariam, 2006). Par ailleurs, les bactéries indicatrices d'hygiène, existe notamment *E. coli*, coliformes fécaux et entérocoques en général (Mariam, 2006). Ils proviennent directement du tube digestif. Cependant, *E. coli* demeure actuellement le seul et le plus sûr des germes tests à utiliser en hygiène publique (Fournaud, 1982). Son dénombrement est rendu obligatoire selon l'arrêté interministériel de spécification microbiologique de 1998 (JORADP, N°35).

II. 2. 2. Germes pathogènes

Les germes pathogènes qui contaminent les viandes et responsables de toxi-infections alimentaires sont en général *Salmonella ssp*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* et récemment *E. coli* entérohemorragique ou *E. coli* O157 : H7 (Dennai et al., 2000).

II. 2. 3. Origine de contamination

Les germes pathogènes ubiquitaires, c'est-à-dire présents et véhiculés par l'eau ou le sol, sont à l'origine de contamination primaire des matières premières alimentaires. *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* ou *Listeria* sont les germes pathogènes les plus fréquemment isolés d'échantillons d'eau ou de sol. Par la suite, lorsque les matières premières sont transformées, elles sont susceptibles d'être contaminées par d'autres micro-organismes présents, même à faible concentration, dans l'usine. Cette niche écologique évolue en fonction de l'environnement de l'usine (air, surface, matériels, personnels...) et des processus technologiques conduisant au produit fini.

Les processus technologiques sont à l'origine de la sélection de la flore psychrotrophe (*Listeria*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Aeromonas*) pour les aliments réfrigérés, ou de germes sporulés (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*) pour les aliments ayant subi un traitement par la chaleur. Les micro-organismes sont également sensibles à nombre de modifications physico-chimiques appliquées à la matière première. Outre la température, le pH, l'activité de l'eau (a_w) ou le potentiel d'oxydoréduction peuvent évoluer et favoriser la colonisation

préférentielle par un micro-organisme pathogène particulièrement adapté à ce nouvel environnement.

Dans le cas particulier des abattoirs, la contamination des carcasses est souvent causée par des germes présents sur la peau, les plumes (*Staphylococcus*, *Listeria*) ou dans le tube digestif et les muqueuses (*Campylobacter*, *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*) des animaux.

II. 2. 4. Toxi-infection liée à la consommation de la viande

En Algérie, les viandes sont à l'origine de 20% de cas de toxi-infections alimentaires après les pâtisseries (21%). En USA ; un exemple de pays développé, le nombre de cas annuels de maladies dues à des agents pathogènes responsables de toxi-infections d'origine alimentaire est estimé à 38,6 millions (Mead et al., 1999). Les deux principaux agents bactériens incriminés dans les toxi-infections d'origine alimentaire (en termes de nombre de cas totaux et de nombre d'hospitalisations) sont *Salmonella* et *Campylobacter*. Viennent ensuite en nombre d'hospitalisations : *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 entérohémorragique, *Staphylococcus* et *Yersinia enterocolitica*. *Salmonella* (30,6 %), *Listeria monocytogenes* (27,6 %), *Campylobacter* (5,5 %) et *E. coli* O157 entérohémorragiques (2,9 %) sont estimés comme étant responsables des plus fortes mortalités aux Uesponsible SA (Mead et al., 1999).

Chapitre II : Microbiologie de la viande

Tableau 5 : Principaux microorganismes pathogènes et leur origines dans la viande hachée (Dailly et *al.*, 2014).

Microorganismes	Maladie/intoxication	Origine	Principales mesures de prévention	Erreurs les plus fréquentes
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intoxication à l'entérotoxine produite par <i>Staphylococcus aureus</i> (au bout de 2 à 4 heures en moyenne)	Peau, muqueuses de l'Homme et des animaux)	Règles d'hygiène pour le personnel et le consommateur Chaîne du froid.	préparer le repas trop longtemps à l'avance, puis maintenir les plats à température ambiante jusqu'à leur consommation.
<i>Salmonelles</i>	Toxi-infection alimentaire	Intestin de l'animal	Bien cuire à cœur le steak haché.	préparations à base d'œufs crus mal conservées
<i>Clostridium perfringens</i>	Toxi-infection alimentaire (8 à 12 heures après la consommation d'un aliment)	Ubiquitaires	Maintenir la température des plats au-dessus de +65°C jusqu'à la consommation ou bien, s'ils sont préparés à l'avance, les refroidir rapidement après leur cuisson (atteindre une température inférieure à +10°C en moins de 2h).	maintenir les aliments à température ambiante entre leur cuisson et leur consommation ou bien les refroidir trop lentement après cuisson.
<i>Bacillus cereus</i>	Intoxication ou bien d'une toxi-infection alimentaire, selon le type de toxine produite par la bactérie	Ubiquitaire	Maintenir la température des plats cuisinés au-dessus de +65°C jusqu'à leur consommation ou bien, s'ils sont préparés à l'avance, les refroidir rapidement après la cuisson (atteindre une température inférieure à +10°C en moins de 2h) ; Conserver au froid (entre 0°C et +4°C) les plats cuisinés et les réchauffer rapidement avant leur consommation.	maintenir les aliments à température ambiante entre leur cuisson et leur consommation ou bien les refroidir trop lentement après cuisson.
<i>Campylobacters</i>	Toxi-infection alimentaire	Tube digestif des volailles principalement et des animaux de boucherie.	Dans le cas de préparation à base de viande hachée, type chair à saucisse, atteindre une température à cœur supérieure à +70°C ; Eviter les contaminations croisées entre aliments :	une cuisson insuffisante de la volaille et de la viande de porc (au barbecue notamment)

II. 3. Critères microbiologiques de la viande hachée

Les critères microbiologiques préconisé par la réglementation algérien sont décrit par l'arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaire (cf. Tableau 6).

Tableau 6 : Spécification microbiologique de l'analyse de la viande hachée selon la réglementation algérienne (JORADP, N° 35 de 1998).

Microorganismes	n	c	m
Germes aérobies à 30°C	5	2	5 10 ⁵
Coliformes fécaux	5	2	10 ²
<i>Escherichia coli</i>	5	2	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	2	10 ²
Clostridium sulfitoréducteurs à 46°C	5	2	30
Salmonella	5	0	Abs/10g

n: nombre d'unités composant d'échantillon ; c : nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs situées entre « m » et « M » ; m : seuil au-dessous duquel le produit est considéré comme étant de qualité satisfaisante ; M : seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considéré comme satisfaisante.

II. 4. Prévention contre les agents microbiens dans la viande hachée

La sécurité alimentaire repose non pas uniquement sur le contrôle mais sur la mise e, œuvre de procédés de fabrication surs et ceci notamment grâce à la mise en place d'une démarche HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*) associé au contrôle légaux des acteurs de la filière et respects de paquets d'hygiène et notamment la gestion de 5 M (cf. Figure 2).

La méthode HACCP repose sur l'application de 7 principes :

- 1 - Procéder à une analyse des dangers (identification des dangers, des causes d'apparition des dangers au cours de la fabrication et des mesures préventives) ;
- 2 - Déterminer les points de maîtrise essentiels (CCP) (étapes dont la maîtrise est essentielle pour assurer la sécurité des produits) ;
- 3 - Pour chaque CCP, fixer les limites critiques (seuils séparant l'acceptable du non acceptable) ;

- 4 - Mettre en place un système de surveillance permettant de maîtriser les CCP (système d'enregistrement et de conservation des données) ;
- 5 - Déterminer les mesures correctives à appliquer lorsque la surveillance révèle qu'un CCP donné n'est pas maîtrisé (permettant de retrouver la maîtrise du procédé et de gérer les produits non conformes) ;
- 6 - Appliquer les procédures de vérification afin de confirmer que le système HACCP fonctionne efficacement (autocontrôles) ;
- 7 - Constituer un dossier dans lequel figurent toutes les procédures et tous les relevés concernant ces principes et leur mise en application (Blanc, 2007).

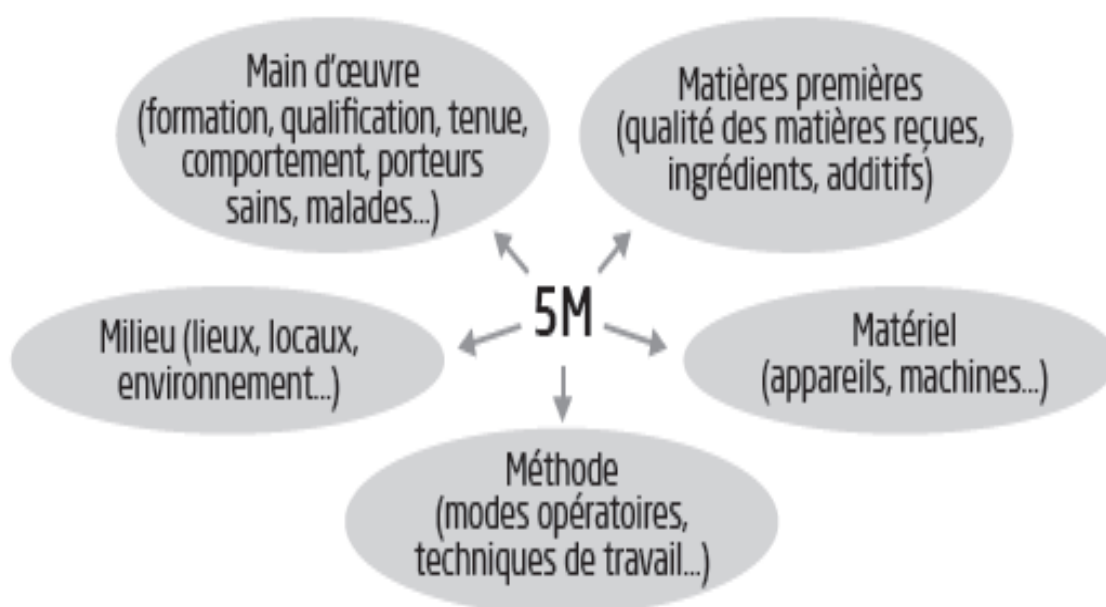


Figure 2 : Schéma représente la méthode 5 M. cette méthode permet de s'interroger, à chaque étape de la fabrication, sur les causes possibles d'apparition des dangers (biologiques, physiques ou chimiques) durant le process, afin de mettre en place des mesures préventives spécifiques et adaptées pour en assurer la maîtrise (Dailly et al., 2014).

II. 5. Micro-organismes non cultivable

De nombreuses espèces bactériennes, et notamment celles pathogènes pour l'Homme, sont décrites comme pouvant se trouver dans un état non cultivable dans l'environnement mais aussi dans les denrées alimentaires. Des germes tels que *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* (Lechaudee, 2010).

Chapitre III

Généralités sur la métagénomique

III. 1. Généralité sur la métagénomique

Le génome est l'ensemble complet du matériel génétique présent dans chaque cellule d'un organisme, virus ou organite (Zaid et *al.*, 2004). Les génomes des êtres vivants possèdent des formes et des structures différentes mais ils ont un point commun : l'Acide désoxyribonucléique (ADN), dont la séquence des nucléotides est la source de l'information génétique (NicKlin et *al.*, 2000). Cependant, certains virus et bactériophage ont comme matériel génétique l'ARN (NicKlin et *al.*, 2000). L'étude de la structure et la fonctionnalité de cette structure d'ADN issue d'un seul microorganisme ou d'une cellule unique est appelée la génomique (Gilbert et Dupont, 2011). Par ailleurs, l'ensemble de génome issue de différentes communautés microbiennes données est appelé le métagénome (NicKlin et *al.*, 2000). L'exploration du métagénome représente une nouvelle stratégie conduisant à faire l'inventaire complet des gènes présents dans un environnement naturel (Guillaume, 2011). De ce fait, l'ensemble de ces méthodes et stratégies constitue une nouvelle branche de la biologie moléculaire : c'est la métagénomique.

Le terme « métagénomique » a été introduit pour la première fois en 1998 par Handelsman et ses collaborateurs (Champomier-Vergès et Zagorec, 2015). Il peut être également appelée génomique environnementale, génomique des communautés, génomique des populations ou encore éco-génomique (DeLong, 2009). Entre autre, la métagénomique, indique l'étude des métagénomomes, qui lui-même réfère à l'ensemble des séquences d'ADN extraites de communautés multi-espèces prélevées dans l'environnement (Baussand et Carbone, 2006). Le préfixe « méta » qui en grec veut dire littéralement « au-delà ou transcendant », induit une distinction majeure entre les termes « métagénomique » et « génomique ».

Il est aussi important de distinguer la métagénomique de l'analyse moléculaire des communautés (la génomique) qui est centrée sur la biodiversité d'un seul gène. Cependant, en métagénomique, tous les gènes d'une communauté microbienne -le métagénome- sont pris en compte, ainsi ses interactions avec son écosystème.

III. 2. Différentes types de métagénomique

La métagénomique est une méthode récente d'étude de l'écologie microbienne.. Selon l'objectif recherché, deux types de méthodes sont envisagées :

- La métagénomique descriptive : fournit une vue relativement non biaisée non seulement de la structure d'une communauté, avec son abondance et sa distribution d'espèces, mais aussi de ses fonctions métaboliques potentielles

(Kurokawa et *al.*, 2007). La métagénomique intégrative : cherche à identifier un changement fonctionnel microbien en fonction d'un changement de l'environnement (Kurokawa et *al.*, 2007).

III. 3. Objectif de la métagénomique

Contrairement à la génomique, l'objectif de la métagénomique n'est pas de produire des séquences des génomes complètes et achevées mais à donner une image génétique beaucoup plus robuste de la communauté microbienne d'un écosystème. Par ailleurs, elle vise à détecter autant de gènes que possible qui codent des protéines identifiables et de déterminer à quel ensemble phylogénétique elles appartiennent (Pheasant and Mattick, 2007). De plus, la métagénomique peut révéler des caractéristiques d'une communauté microbienne omises par une approche via un seul gène. En effet, l'étude métagénomique des procaryotes de la mer des Sargasses a révélé une énorme diversité auparavant ignorée par les analyses basées sur l'ARNr (Pheasant and Mattick, 2007).

III. 4. Réalisation de l'étude métagénomique

La réalisation d'une étude métagénomique est se fait en trois étapes. Ces étapes sont décrites par le rapport de Aviesan de France.

III. 4. 1. Collecte d'échantillons biologiques

Comme montre la figure 2, la collection d'échantillon est l'étape clef de ces études. Les conclusions dépendront de la qualité de cette collection. Il est à souligner aussi qu'une collecte est faite en fonction d'une question particulière.

III. 4. 2. Acquisition des données : génotype, séquençage complets : durant cette étape

L'ADN bactérien est extrait et purifié qui peut être utilisé directement à construire des banques d'ADN métagénomique. Il existe au moins 3 méthodes pour cribler ces banques, de façon moléculaire par hybridation après que l'ADN ait été extrait et déposé sur membrane (cf. figure 3-9) mais aussi en analysant chimiquement le surnageant de culture de façon à identifier les composés produits suite à l'expression de l'insert (cf. figure 3-10).

Comme il peut également subir a des réactions d'amplification puis l'amplicon pouvant être clonés et séquencés offrant, par exemple, la possibilité d'estimer la diversité bactérienne par génération d'arbres phylogénétiques (cf. figure 3 -5). Par ailleurs, Une autre possibilité consiste à utiliser des méthodes de « finger printing » qui produisent des profils de bandes rendant compte de la diversité bactérienne au sein de l'échantillon analysé (cf. figure 3- 6,).

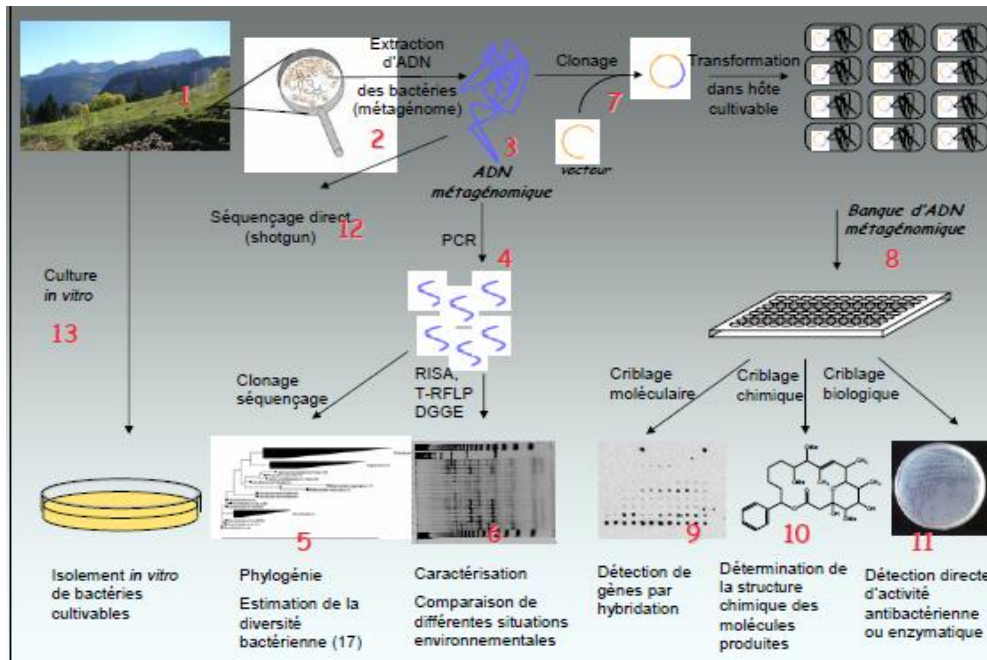


Figure 3 : Différentes étapes d'élaboration d'une étude métagénomique (adapté Simonet, 2005).

III. 4. 3. Organisation des données sous forme de bases de données et leur analyse statistique informatique et bio-informatique

Plusieurs logiciels et base de données ont été développés pour stocker l'ADN métagénomique. Par exemple, le projet Tara Océans, consistait à étudier la diversité et la composition de 300 différents stations. L'ADNr 16S de plus de 103 espèces omniprésentes dans ces stations était séquençé à l'aide des méthodes métagénomiques de séquençage. Les séquences obtenues ont été blasté (base de données NCBI) puis alignée sur le site WCluster. Les résultats d'alignement ont été traités par le Mega5 pour construire l'arbre phylogénétique.

III. 4. 4. Domaine d'application de la métagénomique

La métagénomique présente plusieurs intérêts dans différents domaines :

III. 4. 4. 1. L'apport en biodiversité

Le terme de biodiversité est une contraction de diversité biologique (Magurran, 2004). Il fait donc référence à la variété du monde vivant mais décrit en réalité une notion plus complexe se déclinant en fonction de trois échelles d'intégration : la biodiversité génétique décrivant la variété des gènes au sein des espèces (variété au sein de l'ensemble du vivant); la biodiversité spécifique c'est-à-dire l'ensemble des espèces existantes (variété entre espèces);

et la biodiversité éco systémique décrivant l'ensemble des relations biotiques au sein des écosystèmes (Meisterhans, 2012).

Les études basées sur le séquençage du gène codant pour la sous-unité 16S du ribosome ont permis de décrire la diversité du microbiote avec une grande finesse (Julien, 2009). Plusieurs nouvelles lignées bactériennes, archéennes ou protistes ont ainsi pu être mises en évidence par ce type d'approche.

Les sols sont parmi les environnements qui ont le plus bénéficié de la métagénomique avec la découverte du nouveau phylum des Acidobacteria, qui est ubiquiste et abondant (Liles et al., 2003).

Les connaissances sur la diversité archéenne présente au niveau des sols (Treusch et al., 2004), des sources hydrothermales (Moreira et al., 2004) ou des symbioses en milieu marin (Thompson et al., 2012) ont également énormément progressé de la part des études de métagénomique.

III. 4. 4. 2. L'apport en taxonomie et évolution

Les scientifiques ont depuis toujours cherché à faire l'inventaire des espèces, ou entités biologiques, qui les entourent. La caractérisation des différents organismes composant un écosystème se définit comme la structure des communautés. La taxonomie anime depuis des centaines d'années les zoologistes et botanistes. Chez les plantes et les animaux, les classifications effectuées se sont basées sur un certain nombre de critères complexes, à la fois morphologiques, phénotypiques et dans une moindre mesure physiologiques. Les scientifiques ne se sont cependant pas seulement attachés à classifier les êtres vivants, mais également à établir les relations existantes entre ces différentes entités, et ainsi d'établir des scénarios d'évolution. Ces relations évolutives ont pour la première fois été illustrées sous la forme d'un arbre phylogénétique par Charles Darwin (Darwin, 1859).

Ce scientifique pionnier, souvent critiqué, a réussi à faire émerger l'idée de concept phylogénétique et la systématique moderne comme en atteste les fameux arbres d'Ernst Haeckel (Haeckel, 1866). Au niveau microbien, et notamment pour les bactéries, qui apparaissent comme des systèmes biologiques plus simples d'un point de vue morphologique, les critères physiologiques ont quant à eux été préférés (Van Niel, 1955).

A la fin des années 1960, les biologistes prirent conscience que des molécules comme l'ADN ou les protéines fournissaient une image de l'évolution (Zuckerlandl et Pauling, 1965) et que ces données pouvaient être utilisées pour fabriquer des arbres phylogénétiques (Fitch et Margoliash, 1967).

III. 4. 4. 3. L'apport en métabolisme

La métagénomique permet d'identifier certaines nouvelles fonctions métaboliques, dont certaines d'intérêt biotechnologique.

La métagénomique a utilisé pour révéler également la présence de la protéorhodopsine au sein de nombreuses lignées bactériennes, notamment du clade SAR86 (Béja et *al.*, 2000). Ces photorécepteurs n'avaient été identifiés qu'au sein des archées halophiles (Oesterhelt et Stoeckenius, 1971).

Après caractérisation, ces protéines membranaires se sont avérées être des pompes à protons permettant la synthèse d'ATP sous l'action de la lumière (Béja et *al.*, 2000). Cette nouvelle famille de rhodopsine, pour lesquels deux variants spectraux ont été identifiés, a permis de définir un nouveau type de phototrophie au sein des environnements marins (Béja et *al.*, 2001).

Les études métagénomiques ultérieures ont permis de révéler la forte abondance et la distribution globale des protéorhodopsines au sein de différentes lignées bactériennes et archéennes marines (Rusch et *al.*, 2007). Les processus évolutifs ayant permis, aussi, d'établir cette large répartition phylogénétique (McCarren et DeLong, 2007).

La protéorhodopsine est également présente chez l' α -protéobactérie *Candidatus Pelagibacter ubique* (Giovannoni et *al.*, 2005).

Le rôle de la protéorhodopsine reste peu documenté, mais fournirait un avantage métabolique en présence de lumière (Lami et *al.*, 2009), en augmentant notamment la capacité de survie des cellules en milieu dépourvu en nutriments (DeLong et Béja, 2010).

Parallèlement, de nouveaux types de photosynthèse aérobie anoxygénique (AAP) ont été identifiés par des approches de métagénomique (Béja et *al.*, 2002).

Les bactéries AAP, utilisant de la bactériochlorophylle a pour capturer l'énergie lumineuse, présentent une large distribution au sein des océans (Kolber et *al.*, 2001).

La majorité des gènes impliqués, notamment *bchet crt*, codant respectivement pour la bactériochlorophylle a et les voies de biosynthèse des caroténoïdes, ainsi que les gènes *puf*, codant pour le centre réactionnel, sont inclus dans une région génomique de 45 Kpb (Alberti et *al.*, 1995). Ces gènes initialement découverts chez les α -protéobactéries ont par la suite été mis en évidence au sein de la classe β et γ , ainsi que chez les Roseobacterales (Béja et *al.*, 2002; Fuchs et *al.*, 2007).

La découverte de ces deux modes de phototrophie en milieu marin a complètement changé la vision du monde scientifique sur la nature et la diversité des systèmes utilisant la lumière comme source d'énergie.

IV. Matériel et méthodes

La totalité des manipes a été réalisé au laboratoire pédagogique de microbiologie de département de Biologie, université de Laghouat. Le dosage de l'ADN a été effectué au niveau de laboratoire pédagogique de biochimie de la faculté de Médecine, Université de Laghouat.

IV. 1. Echantillonnage et prélèvement de la viande hachée

Les échantillons de la viande hachée ont été prélevés de la ville de Laghouat (cf. **Figure** 04). Les points de vente ont été repérés suivant la méthode aréolaire (Grawits, 2001). Au total 21 échantillons ont été prélevés puis transférés au laboratoire pour l'analyse.

IV. 2. Transport des échantillons au laboratoire

L'ensemble des échantillons prélevés ont été transférés au laboratoire à 4°C pour l'analyse microbiologique et l'extraction de l'ADN métagénomique.

IV. 3. Recherche et dénombrement de la flore totale mésophile

Cette étape vise à mettre en évidence la contamination microbienne de la viande hachée. La recherche de la flore totale mésophile a été réalisée sur milieu PCA selon la procédure décrite par journal officiel algérien.

Elle consiste à préparer une dilution décimale à partir des échantillons de la viande hachée. La dilution a été réalisée dans l'eau physiologique stérile.

Une masse de 1g de chaque échantillon de la viande hachée a été homogénéisée dans un tube stérile contenant 9mL de l'eau physiologique. L'homogénéisation a été effectuée à une grande vitesse à l'aide de vortex pendant 10min. Ensuite, une série de dilution a été réalisée t jusqu'à la dilution de 10^{-6} . Il est très important d'homogénéiser la dilution avant chaque transfert.

Ensemencement

Un volume de 1 mL de chaque dilution a été déposé dans des boites de Pétri de 90mm vide, puis coulé avec 14mL de la gélose PCA. Ensuite, les cultures ont été homogénéisées par

mouvement en forme de 8. Après solidification, les cultures ont été incubées à 30°C pendant 24h à 48h.

Lecture

L'ensemble des colonies obtenues a été compté qui représente l'ensemble de microorganismes capable de se multiplier à 30°C dans les conditions de mésophilie et en présence d'oxygène.

IV. 4. Construction de la banque d'ADN métagénomique

L'ADN métagénomique a été extrait selon la méthode classique de l'extraction d'ADN génomique.

Extraction de l'ADN

Une masse de 10g approximativement de la viande hachée a été diluée dans un volume égal de TS (X10) puis homogénéisé à l'aide de vortex à haute vitesse pendant 10 minutes. Ensuite, l'homogénat obtenu a été filtré à l'aide des filtres stériles. Le filtrat récupéré a été incubé pendant 20 minutes à 30°C en présence de 500 µl de protéase K. Ensuite, un volume de 2mL de la solution de lyse était ajouté au lysat enzymatique puis apportée au bain marie à 55°C pendant 30 minutes. Après la lyse alcaline, un volume de 2mL du phénol-chloroforme-alcool isoamylique a été ajouté, puis agité jusqu'à l'obtention d'un aspect laiteux.

Le mélange était centrifugé 35 min à 4000 tours par minutes. Le surnageant a été récupéré dans des tubes Eppendorf vide et stérile puis lui ajouté 700µl de la solution d'acétate de sodium + 400µl d'Alcool-isoamylique (froid) puis apporté à -20 °C pendant 30 minutes. Ensuite, le mélange est centrifugé pendant 35 min à 4000 tours par minutes. Le culot obtenus étaient lavé à de l'éthanol à 70% (500µL) puis centrifugé «35 minutes (4000g). Le lavage était répété deux fois. En fin, les culots lavés ont été séchés à étuve à 37 °C pendant 30 minutes. Ensuite, les culots de l'ADN ont été solubilisé dans 250 µl d'eau distillée puis conservés à -20°C.

Quantification et vérification de pureté de l'ADN métagénomique

L'ADN métagénomique obtenu précédemment était dilué dans de l'eau permutée puis dosé grâce à un spectrophotomètre d'absorption. L'absorbance de l'ADN était mesurée dans le spectre de la lumière Ultraviolette (UV) de 220 à 300 nm. Un volume de 2ml d'une dilution

au 1/50^{ème} de l'échantillon de l'ADN dans l'eau permutée était déposé dans une cuve en Quartz. Après avoir calibré le spectrophotomètre, l'absorbance des échantillons a été mesurée.

La courbe de balayage d'absorbance permet de renseigner sur la pureté et la quantité de l'ADN génomique à la fois. Le chevauchement du pic maximal de 260 nm reflète une contamination chimique. Par ailleurs, la détermination des rapports $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ et $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ permet de vérifier la nature du contaminant chimique.

La valeur de rapport $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ doit être comprise entre 1,8 et 2 en termes d'absorbance. Il permet d'évaluer la contamination par les protéines.

En outre, la valeur du rapport $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ est déduite à titre secondaire pour renseigner sur une éventuelle contamination par les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques ou tout produit qui absorbe à 230nm. Ce rapport doit être proche de 2,2.

IV. 5. Confirmation par électrophorèse d'agarose

Les échantillons de l'ADN métagénomique ont été envoyés au laboratoire de Génétique Moléculaire et Cellulaire: Biologie Moléculaire, université de l'USTO, Oran.

L'ADN était révélé sur 1% de gel d'agarose (w/v). La migration était réalisée dans le tampon TAE 1M (Tris-acétate-EDTA 1M) avec un courant électrique de 5V/cm.

Lorsque la ligne jaune de tampon de charge arrivait au front de migration, le courant électrique qui alimente le dispositif de l'électrophorèse était arrêté. Ensuite, le gel était récupéré de support puis trempé dans un bain de bromure d'éthidium (0.5µg/ml) pendant 30 minutes. Enfin, la révélation des bandes était effectuée par observation du gel sous la lampe UV.

V. Résultats et discussion

La recherche et dénombrement de microorganismes e dénombrement de la flore totale mésophile n'a pas pour objectif d'évaluer la qualité microbiologique de la viande hachée vendu dans la ville de Laghouat, mais plutôt de monter la présence de bactéries dans la viande. Car l'ADN métagénomique obtenu à la fin de projets présente certainement l'ADN génomique des cellules de la viande. De ce fait, le dénombrement de bactéries permet de confirmer qui est probablement l'ADN métagénomique obtenu peut renferme l'ADN de ces bactéries.

V. 1. Dénombrement de la flore totale mésophile

Les résultats de dénombrement de la flore totale mésophile ont montré une contamination de l'ensemble des échantillons analysés de la viande. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Agbodaze et *al.* (2005). Cependant, Kumar et *al.* (2014) ont montré une faible prévalence de contamination de la viande hachée commercialisé en Inde. Par ailleurs, dans cette étude le niveau de contamination est dans l'ordre de 10^2 à 10^4 bactéries par gramme de la viande hachée (cf. Tableau 07 & Figure 05). Ces résultats sont en concordance avec les résultats de travaux cités auparavant.

Cette contamination est probablement due aux conditions d'hygiène et non-respect de bonnes pratiques de fabrication surtout que cette filière demande beaucoup de vigilance.

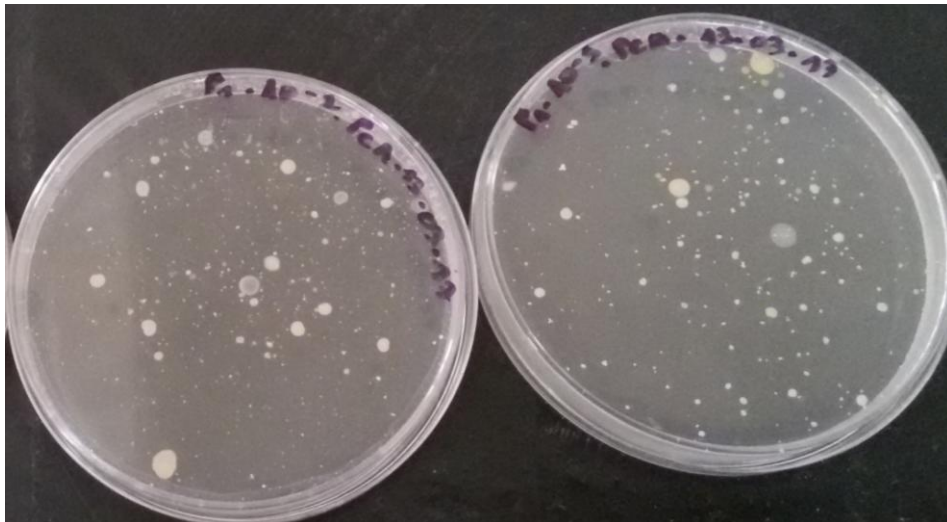


Figure 05: Colonies de la flore totale mésophile sur milieu PCA incubé à 30°C pendant 48h.

Tableau 07 : Contamination de la viande hachée par flore aérobie totale mésophile (FAMT).

Nombre des échantillons analysés	Prévalence de contamination (%)	Concentration de FAMT (ufc/g)	
		21	100
		Max	10 ⁶
		Moy	10 ³

V. 2. Obtention de l'ADN métagénomique de la viande hachée

Comme il est expliqué par Giacomazzi et *al.* (2005), il n'y a pas des protocoles d'extraction de l'ADN métagénomique (ADNm_g) normalisés. En effet, selon Tang et *al.* (2009) et Zhou et *al.* (1996), le choix du protocole est dépendant des caractéristiques physico-chimiques (structure de la paroi cellulaire), chimique et biologique (adhérence du micro-organisme) et même de la matrice alimentaire.

Dans cette étude le protocole utilisé pour isoler l'ADN métagénomique est inspiré de la méthode classique modifiée selon Sambrook et *al.* (1989). Cette méthode est utilisée dans le but d'optimiser une méthode classique faisable au niveau de nos laboratoire. Dans ce récent domaine, diverse kits sont utilisés qui dépend de microorganismes et de la matrice alimentaire étudiées. Malheureusement, ces Kits de l'extraction sont couteux et son acquisition est longue. Cette méthode a été également utilisée par Gonzalez-de la Cruz et *al.* (2011) et Rojas-Herrera et *al.* (2008). Ces méthodes étaient utilisées pour l'extraction de l'ADNm_g bactérien à partir du sol et les sédiments, l'intestin et de l'estomac de crevettes *M. Carcinus* (données non publié par son auteur) (Gonzalez-de la Cruz et *al.*, 2011, Felczykowska et *al.*, 2015). Par ailleurs la méthode plus adapté et efficace sont décrites par Agata et *al.* (2014).

Tout d'abord, chaque étape utilisée visait à des objectifs bien connus. Le broyage des échantillons de la viande hachée dans le TSE éclate toutes les cellules pour libérer éventuellement des microorganismes probablement introduits dans les cellules durant le hachage de la viande, d'un côté. Et d'autre côté de détacher les microorganismes attachés à la surface de tissu et de suspendre les microorganismes pour faciliter la lyse de cellules. Le broyat est ensuite filtré dans les conditions aseptiques. D'autre intérêt de broyage et agitation à une vitesse maximale de vortex est de macérer la matière grasse et les triglycérides car ils gênent l'extraction de l'ADNm_g. Cette macération est recommandé par

(Muriana et *al.*, 1993). Ensuite, le filtrat est récupéré puis traité avec l'enzyme protéase pour lyser les cellules principalement les Gram positif. Le lysat enzymatique obtenu est ensuite apporté au bain marie pour finaliser la lyse des cellules non affecté par l'action enzymatique.

Le mélange est agité à l'aide de vortex entre chaque étape pour assurer la dispersion complète de cellules microbiennes omniprésentes car l'agrégation des cellules gêne l'action de détergeant utilisé pour la lyse alcaline. L'EDTA utilisé pour fragiliser la membrane et comme chélateur des cations métalliques divalents (le calcium et le magnésium), ce qui déstabilise la membrane bactérienne, et inactive les DNases. En effet, le magnésium est un cofacteur de l'ADNase (Zimmermann et *al.*, 1998). Le Tris sert à tamponner le milieu d'extraction. Le SDS est un détergeant ionique servant à lyser les membranes et à dénaturer les protéines et les acides nucléiques (rupture des liaisons hydrogènes et des liaisons hydrophobes) et le NaOH, base forte, induit une augmentation du pH et dénature aussi les protéines et les acides nucléiques. À pH basique, les deux brins de l'ADN se séparent. Le chromosome bactérien, très fragile, se linéarise en grands fragments.

A la fin de cette étape, le lysat obtenu a donné un aspect visqueux jaunâtre pour certains échantillons et répétitions. Visuellement quelques mélanges ont donné un aspect correspondant à celui recherché. Cependant, cet aspect n'a aucune relation avec le rendement de la méthode ni à la quantité de l'ADN à purifier.

Ces techniques de lyse sont utilisées généralement pour des cultures microbiennes pures. Elles ont montré leur efficacité pour n'importe quels acides nucléiques souhaités (ARN, ADN génomique ou bien extrachromosomique). On cite à titre d'exemple les travaux de Ziane et *al.* (2014 ; 2016) pour les Gram positif. Cependant, pour l'ADN métagénomique est un peu compliqué car le facteur de la matrice alimentaire et la faible concentration de microorganismes gêne la lyse des cellules difficile. La lyse dans les Kits commerciales est basée sur le même principe comme le Kit utilisé par Delcenserie et *al.* (2014).

Le lysat obtenu présente l'ensemble des inclusions cellulaires musculaires, bactériennes et même l'ADN libre ou bien des cellules microbiennes mortes y compris aussi les protéines. De ce fait, l'extraction de l'ensemble d'ADN est basée sur le traitement de lysat par phénol-chloroforme-isoamylique (25 :25 :1) (Kamoun, 2003). Le phénol consiste à déprotéiniser le lysat. Selon Kamoun (1997), une meilleure déprotéinisation est réalisée à la température ambiante pendant 15 min. Le traitement au chloroforme consiste à éliminer les traces de phénol restées dans la phase aqueuse. Toute trace de phénol doit être

éliminée pour permettre l'action ultérieure d'enzyme (de restriction par exemple) sur l'acide nucléique extrait (Ameziane et *al.*, 2005) et les enzymes ADN polymérase. Le mélange de lysat et le mélange phénol –chloroforme donne deux phases non miscibles. Ce mélange est agité par retournement, afin d'éviter la dégradation de l'ADN, jusqu'au l'obtention d'une phase laiteuse stable.

L'extraction phénol-chloroforme aboutit à l'obtention de deux phases bien séparées. La phase supérieure contient les acides nucléaires. Par contre les protéines précipitent et sédimentent au fond de la phase aqueuse mais et elles restent à l'interface c'est-à-dire qu'elles restent à la surface de la phase phénolique qui est une phase hydrophobe. Le phénol est utilisé et efficace pour l'extraction de l'ADN mais présente un inconvénient réside dans son caractère très corrosif.

En revanche, pour la méthode de Kit l'extraction à l'aide de colonne de chromatographie est plus utilisée et donne des meilleures extractions. Cette phase a permis d'extraire l'ADN et de le purifier à la fois.

Pour la méthode utilisée dans cette étude, l'ADN était précipité par l'ajout de l'acétate sous forme des filaments, où l'acétate de Na 3M à pH 5,2, permet aux brins d'ADN de se réapparier de façon complémentaire.

Ensuite, l'acétate a été additionné d'alcool éthylique (moins polaire que l'eau) et après la centrifugation, les acides nucléiques ont été précipités sous forme solide.

L'ADN obtenue est lavé 2 fois à l'aide d'alcool (éthanol à 70 %) qui solubilise toutes les impuretés indésirables pour dissoudre et éliminer les sels et restituer ses propriétés physico-chimiques à l'ADN.

Les culots d'ADN obtenues ont été de quantités différentes d'une souche à une autre qui également proportionnelles aux quantités de culots bactériens obtenues après centrifugation des pré-cultures.

V. 3. Estimation de la quantité d'ADN métagénomique

La quantité de l'ADN métagénomique extraite à partir de chaque souche a été évaluée par la mesure de l'absorbance à 260 nm. Une unité d'absorbance correspond à 50 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Le dosage de l'ADN mg dans l'ensemble des échantillons a révélé des quantités de l'ADN dans 30% des échantillons. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Gonzalez-de la Cruz et *al.* (2011) qui n'ont pas obtenu de l'ADNmg.

Le ADNmg extrait a enregistré une concentration de 0,17 à 0,58 µg / g de viande hachée. Il est considéré que les résultats de l'absorbance a été observée entre la plage de

faible qualité comme montré aussi par Glasel (1995). Dans ce cas, c'est prudent avant l'amplification de l'ARNr 16S gène par PCR purification. Cette quantité d'ADN peut contenir l'ADN génomique des cellules animales mais l'amplification sélectionne les gènes microbiens à amplifier.

Ces résultats sont probablement expliqués par les hypothèses Rojas-Herrera *et al.* (2008) et Ahearn (1978) qui sont déduit que la présence d'inhibiteurs potentiels dans les échantillons analysés pourrait limiter la récupération d'ADN.

Par ailleurs l'immigration des bandes d'ADN métagénomiques sur le gel d'Agarose n'a pas montré des bonnes révélations à cause de contamination par ARN et mauvaise extraction ?

CONCLUSION

La métagénomique est devenue une méthode fiable et efficace pour étudier la biodiversité de microorganismes d'un écosystème alimentaire et/ou son environnement. De ce fait, nous avons testé une méthode classique connue de son efficacité dans l'extraction de l'ADN génomique. La méthode utilisée a permis d'obtenir l'ADN métagénomique que pour 30% des échantillons ou bien de préparation avec des concentrations d'ADNmg faibles de l'ordre de 0,1 à 0,6 µg/g de la viande hachée. En effet, la matrice alimentaire a des effets sur le rendement de l'extraction et qui était montré par Muriana et *al.* (1993). Il a proposé une macération vigoureuse pour détendre les acides gras, suivie d'une incubation (65 ° C pendant 10 min) et centrifugation (10 000 x g pendant 10 min à 40 ° C); dans le but de briser et à séparer ces chaînes saturées. L'échantillon a été congelée (-10 ° C pendant 10 min) et centrifugé (10 000 xg pendant 10 min à 4 ° C). Enfin, une matière grasse, la phase aqueuse et la récupération de la tablette a été obtenu ces deux derniers, pour l'extraction ultérieure de l'ADN metagénomique. Cette méthode a besoin d'optimiser la technique. De ce fait, nous proposons de :

- Broyer infiniment les échantillons de la viande hachée dans des tampons limitant l'action enzymatique sur l'ADN ;
- Extraire la matière grasse avec des solutions tensioactive ;
- Intégrer la lyse ultrasons pour éclater l'ensemble des cellules ;
- Utiliser l'extraction phénol chloroforme en deux reprise ;
- Centrifuger à haute vitesse de 10000 g pendant plusieurs minutes plus que l'ADN génomique ;
- Préparation à des volumes élevés pour les premières préparations.

Au terme de ce travail, nous envisageons d'optimiser le protocole et faire une étude de la biodiversité microbienne dans la viande hachée après le séquençage de gène d'ARNr 16S.

Références bibliographiques

1. Agata W A. Martin I B. Vera C. Karsten K. Thomas S P. Ramneek G. 2014. Choice of bacterial DNA extraction method from fecal material influences community structure as evaluated by metagenomic analysis. *Microbiome*. 2, 19.
2. Agbodaze D. Nmai P N A. Robertson F C. Yeboah-Manu D. Owusu-Darko K. Addo K K. 2005. Microbiological quality of “Khebab” consumed in the Accra metropolis. *Ghana Medical Journal* 39(2), 46-49.
3. Alberti M., Burke D H. et Hearst J E. 1995. Structure and sequence of the photosynthesis gene cluster. In *Anoxygenic Photosynthesis Bacteria*. Blankenship, R.E., Madigan, M., and Bauer, C.E. (eds). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer, pp. 1083-1106.
4. Bailly J D. Bruyère H. Chardon H. 2014. Microorganismes et parasites des viandes : les connaître pour les maîtriser, de l'éleveur au consommateur.
5. Baussand J. et Carbone A. 2007. Métagénomique bactérienne et virale : Nouvelles définitions d'espace microbien et nouveaux défis algorithmiques. *Technique et science informatiques*. 26 (1-2), 217-227.
6. Beja O., Marcelino T S., Eugene V K., *et al.* 2000. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. *Environ. Microbiol.* 2, 516–529.
7. Blanc D. 2009. *ISO 22000, HACCP et sécurité des aliments - Recommandations, outils, FAQ et retours de terrain*. Edi. 432 p.
8. Champomier-Vergès M C. et Zagorec M. 2015. *La métagénomique : Développements et futures applications*. ISBN: 978-2-7592-2293-3, Editions Quae.
9. Darwin C. 1859. *On the origin of species*. Albemarle Street. London: John Murray.
10. DeLong E F. 2009. The microbial ocean from genomes to biomes. *Nature*. 459, 200-206.
11. DeLong E F. et Béjà O. 2010. The light-driven proton pump proteorhodopsin enhances bacterial survival during tough times. *PLoS Biol.* 8 (4), e1000359.
12. Felczykowska A. Bloch S K. Nejman-Faleńczyk B. Barańska S. 2012. Metagenomic approach in the investigation of new bioactive compounds in the marine environment. *Acta Biochim Pol.* 59(4), 501-5.
13. Fitch W M. et Margoliash E. 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science*. (760), 279-284.
14. Fuchs B M., Spring S., Teeling H., Quast C., Wulf J., Schattenhofer M., Yan S., Ferreria S., Johnson J. et Glöckner F.O. 2007. Characterization of a marine

- gammaproteobacterium capable of aerobic anoxygenic photosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 104 (8), 2891-2896.
15. Giacomazzi S. Leroi F. Joffraud J J. 2005. Comparison of three methods of DNA extraction from cold-smoked salmon and impact of physical treatments. *Journal of Applied Microbiology*. 98, 1230-1238.
 16. Gilbert J A. et Dupont C L. 2011. Microbial metagenomics : beyond the genome. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 3, 347-71.
 17. Giovannoni S J., Tripp, H J., Givan S., Podar M., Vergin K L., Baptista D., Bibbs L., Eads J., Richardson T H. et Noordewier M. 2005. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science*. 309 (5738), 1242-1245.
 18. Glasel J A. 1995. Validity of Nucleic Acid Purities Monitored by A260/A280 Absorbance Ratios. *Biotechniques*. 18, 62-63.
 19. González-de la Cruz J. Delfín-González H. Ma. C. de la Cruz-Leyva; R. Rojas-Herrera A. Zamudio-Maya M. Protocol for extraction of bacterial metagenome DNA to prawn *Macrobrachium carcinus* L. *Trop. subtrop. Agroecosyt.* 14, 3.
 20. Haeckel E. (1866). *Generelle Morphologie der Organismen : Allgemeine Grundzüge der organischen Formen Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte Descendenz Theorie* . Berlin: Georg Reimer.
 21. Hearn G.A. 1978. Allosteric cotransport of sodium, chloride and calcium by the intestine of freshwater prawns. *Journal of Membrane Biology*. 42, 281-300.
 22. [Joffin](#) J N. et [Joffin](#) C. 2010. *Microbiologie alimentaire (Broché)*. 6e édition.
 23. JORADP (Journal officiel de la république Algérienne Démocratique et populaire), N°35 modifiant et complétant l'arrêté du 23 juillet 1994, relatif aux critères microbiologiques de certaines denrées alimentaires. (1998).
 24. Julien T. 2009. Impact du régime alimentaire sur la dynamique structurale et fonctionnelle du microbiote intestinal humain. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie curie
 25. Kolber Z S., Gerald F., Lang A S., Beatty J T., Blankenship R E., VanDover C L., Vetriani C., Koblizek M., Rathgeber C. et Falkowski P G. 2001. Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science*. 292 (5526), 2492-2495.

26. Kumar P. Rao. Y. [Manjunath](#) H. 2014. Microbiological Quality of Meat Collected from Municipal Slaughter Houses and Retail Meat Shops from Hyderabad Karnataka Region, India. *APCBEE Procedia*. 8, 364-369.
27. Kurokawa K., Itoh T., Kuwahara T., Oshima K., Toh H., Toyoda A., Takami H., Morita H., Sharma V K., Srivastava T P., et al. 2007. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res*. 14, 169–181.
28. Lami R., Cottrell M T., Campbell B J. et Kirchman D L. 2009. Light -dependent growth and proteorhodopsin expression by Flavobacteria and SAR11 in experiments with Delaware coastal waters. *Environ. Microbiol*. 11 (12), 3201-3209.
29. [LECHAUDEE D](#) Analyse des bacteries non cultivables. CNAM - Ingénieur 2010.
30. Liles M R., Manske B., Bintrim S., Handelsman J. et Goodman R. 2003. A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol*. 69, 2684–2691.
31. Madigan M. et Martinko J. 2007. Brock Biologie des micro-organismes : Pearson Education, France.
32. Magurran A E. 2004. Measuring biological diversity. Oxford: Blackwell Science.
33. Mariam K A 2006. Evolution de la flore bactérienne des viandes de bœuf hachées au cours d'un stockage réfrigéré.
34. McCarren J. et DeLong E F. 2007. Proteorhodopsin photosystem gene clusters exhibit co-evolutionary trends and shared ancestry among diverse marine microbial phyla. *Environ. Microbiol*. 9 (4), 846-858.
35. Meisterhans G. 2012. Dynamique de la structure génétique des communautés procaryotes en zone benthique côtière : caractérisation de la microflore des sédiments et des bivalves fouisseurs par empreintes moléculaires.
36. MetaHIT. [<http://www.metahit.eu/>]
37. Moreira D., Rodriguez-Valera F. et Lopez-Garcia P. 2004. Analysis of a genome fragment of a deep-sea uncultivated Group II euryarchaeote containing 16S rDNA, a spectinomycin-like operon and several energy metabolism genes. *Environ. Microbiol*. 6, 959-969.
38. Muriana F J. Ruiz-Gutierriz V. Bolufer J. 1993. Phospholipid fatty acid composition of hepatopancreas and muscle from prawn, *Penaeus japonicus*. *Journal of Biochemistry*. 114, 404-407

39. Oesterhelt D. et Stoeckenius W. 1971. Rhodopsin - like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium. *Nature*. 233 (39), 149-152.
40. Pheasant M. et Mattick J S. 2007. *Genome Adv. Res.* 17, 1245-1253.
41. Rojas-Herrera R. Narváez-Zapata J. Zamudio-Maya M. Mena-Martínez M E. 2008. A Simple Silica-based Method for Metagenomic DNA Extraction from Soil and Sediments. *Mol Biotechnol.* 40, 13-17.
42. Rusch D B., Halpern A L., Sutton G., Heidelberg K B., Williamson S., Yooseph S., Wu D., Eisen J A., Hoffman J M., Remington K., et al. 2007. The Sorcerer II global ocean sampling expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biol.* 5:e77.
43. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.H., 1989. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
44. Simonet P. 2005. *Approches méta-génomiques en Microbiologie*. p 40.
45. Tang W. David F B. Wilson M M. Barwick B G. Leyland-Jones B R. Bouzyk M M. 2009. DNA Extraction from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. *Cold Spring Harbor Protocols*. DOI:10.1101/pdb.prot5138.
46. Zaid H., Hughes G., Porceddu E. et Nicholas F. 2004. *Glossaire de la biotechnologie pour l'alimentation et l'agriculture*. FAO, Rome. ISBN 92-5-204683-6.
47. Zhou J. Brans M A. Tiedje J M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology.* 62, 316-322.
48. Ziane M. Couvert O. Le Chevalier P. Moussa-Boudjemaa B. Leguérinel I. 2016. Identification and characterization of aerobic spore forming bacteria isolated from commercial camel's milk in south of Algeria. *Small Ruminants Research.* 137, 59–64.
49. Ziane M. Desriac N. Le Chevalier P. Couvert O. Moussa-Boudjemaa B. Leguérinel I. 2014. Identification, heat resistance and growth potential of mesophilic spore-forming bacteria isolated from Algerian retail packaged couscous *Food Control* 45, 16-21.
50. Zuckerkandl E. et Pauling L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theoret. Biol.* 8(2), 357-366.
51. Zuliani V et Garry P 2004. Les germes pathogènes dans l'industrie agroalimentaire. *Bulletin de liaison du CTSCCV / VOL. 14, pages 12-1.*

