

---

**Revue**  
**Nature et Technologie**

---

Academic Journal with an International Dissemination

---

**Volume 13**  
**Numéro 2**





**Classe A : Fundamental & Engineering Sciences**

**Analyse des mesures pendulaires d'auscultation par le modèle HST : cas du barrage Béni-Haroun .....01-13**

Mounia GAHLOUZ<sup>a</sup>, Bachir GOURINE<sup>a</sup>, Smail GABI<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Centre des Techniques Spatiales, 1 avenue de la Palestine, Arzew, 31200, Algérie

<sup>b</sup> Université de Mouloud Mammeri, Nouvelle ville, Tizi-Ouzou, 15000, Algérie

**Class B : Agronomic & Biological Sciences**

**An investigation of the practices of veterinarians and breeders in the prevalence of antibiotic resistance in poultry farms in Algeria.....14-33**

Yahya MERAZI<sup>a,\*</sup>, Kheira HAMMADI<sup>a</sup>, Firdaous Faiza FEDOUL<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratory Educational Microbiology, Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem, B.P. 188, 27000, Algeria.

<sup>b</sup>Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Djillali Liabes University, Sidi Bel Abbes, B.P. 89, 22000, Algeria.

**Cloning, expression, and structural modeling of two alkaline serine protease genes from extremophilic Bacillaceae-related species: Application in valorization of invasive crustaceans .....34-51**

Sondes MECHRI<sup>a</sup>, Khelifa BOUACEM<sup>b,c</sup>, Fawzi ALLALA<sup>b</sup>, Marwa KHALED<sup>b</sup>, Amel BOUANANE-DARENFED<sup>b</sup>, Hocine HACENE<sup>b</sup>, Bassem JAOUADI<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Microbial Biotechnology and Engineering Enzymes (LMBEE), Centre of Biotechnology of Sfax (CBS), University of Sfax, Road of Sidi Mansour Km 6, P.O. Box 1177, Sfax 3018, Tunisia

<sup>b</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Biology (LCMB), Microbiology Team, Faculty of Biological Sciences (FSB), University of Sciences and Technology Houari Boumediene (USTHB), P.O. Box 32, El Alia, Bab Ezzouar, 16111 Algiers, Algeria

<sup>c</sup>Department of Biochemistry & Microbiology, Faculty of Biological and Agricultural Sciences, University Mouloud Mammeri of Tizi-Ouzou (UMMTO), P.O. Box 17, Tizi-Ouzou 15000, Algeria

**Étude de l'activité biologique de l'huile essentielle de l'Origan (Origanum glandulosum L.) sur l'histophysiologie du tube digestif des adultes de Schistocerca gregaria (Forskål, 1775) .....52-60**

Kamel HAMADI<sup>a,\*</sup>, Amel BOUDJENOUIA<sup>b</sup>, Nassima KACI<sup>b</sup> et Bahia DOUMANDJI-MITICHE<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Dynamique et Biodiversité, Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Alger, Algérie.

<sup>b</sup> Université M'hamed Bougara, Faculté des Sciences, Département d'Agronomie, Boumerdes, Algérie.

<sup>c</sup> École Nationale Supérieure Agronomique, Département de Zoologie agricole et forestière, Alger, Algérie.

**Preliminary screening and characterization of novel proteolytic enzymes produced by extremophilic bacteria isolated from Tunisian and Algerian biotopes .....61-73**

Sondes MECHRI<sup>a</sup>, Khelifa BOUACEM<sup>b,c</sup>, Fawzi ALLALA<sup>b</sup>, Marwa KHALED<sup>a</sup>, Amel BOUANANE-DARENFED<sup>b</sup>, Hocine HACÈNE<sup>b</sup>, Bassem JAOUADI<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Microbial Biotechnology and Engineering Enzymes (LMBEE), Center of Biotechnology of Sfax (CBS), University of Sfax, Road of Sidi Mansour Km 6, P.O. Box 1177, Sfax 3018, Tunisia

<sup>b</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Biology (LCMB), Microbiology Team, Faculty of Biological Sciences (FSB), University of Sciences and Technology Houari Boumediene (USTHB), P.O. Box 32, El Alia, Bab Ezzouar, 16111 Algiers, Algeria

<sup>c</sup>Department of Biochemistry & Microbiology, Faculty of Biological and Agricultural Sciences (FBAS), University Mouloud Mammeri of Tizi-Ouzou (UMMTO), P.O. Box 17, Tizi-Ouzou 15000, Algeria

**Etude comparative de l'influence de la désamerisation par le sel sur la qualité sensorielle de deux confitures : bigarade et pamplemousse .....74-84**

Samira LAGHA-BENAMROUCHE<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara, Boumerdès 035000, Algérie

<sup>b</sup> Laboratoire de recherche Technologie douce, Valorisation, Physicochimie de Matériel Biologique et Biodiversité, Faculté des Sciences, Université UMBB, Boumerdès 35000, Algérie

---

**Prévalence et répartition de la bactérie *Paenibacillus larvae* (Agentcausal de la Loque américaine) au niveau de quelques ruchers de larégion centre d'Algérie .....85-93**

ADJLANE Noureddine <sup>a,\*</sup> et HADDAD Nizar <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Département d'Agronomie, Université M'hamed Bougara, Avenue de l'indépendance, Boumerdes, 35 000 Algérie.

Laboratoire de Bioinformatique, Microbiologie Appliquée et Biomolécules (BMAB), Université M'Hamed Bougara de Boumerdès

<sup>b</sup> National Agricultural Research Center. P.O. Box 639-Baqa' 19381. Jordan.

---

**Techniques utilisées pour le contrôle de la qualité structurale des viandes et des produits carnés (Review).....94-108**

Rahma GUELMAMENE<sup>a</sup>, Omar BENNOUNE<sup>a</sup>, Rachid ELGROUD<sup>b</sup>

Institut des sciences vétérinaires et des sciences agronomiques, université Batna 1 , Algérie <sup>b</sup> Institut des sciences vétérinaires d'ElKhroub, Université des frères Mentouri de Constantine 1, Algérie

---

**Classe C : Environmental Sciences**

---

**Bilan de la première transplantation d'arbres de ficus (*Ficus retusa*) en Algérie .....109-119**

Yahia CHEBOUTI<sup>a,\*</sup>, Aissa MIHOUBI<sup>a</sup>, Kaddour MAAMAR-KOUADRI<sup>a</sup>, Nadjiba CHEBOUTI-MEZIOU<sup>b</sup>, Naima IFTICENE-HABANI<sup>c</sup>

<sup>a</sup> INRF-Baraki, Alger, Algérie

<sup>b</sup> Université M'hamed Bougara de Boumerdes. FS. Labo : LTDVP, Algérie

<sup>c</sup> Université d'Alger 1, FSNV, Algérie

---

**Modélisation par l'entropie maximale de l'habitat potentiel du cèdre de l'atlas au Maroc (*Cedrus atlantica***

**Manetti).....120-128**

Said LAARIBYA<sup>a,\*</sup> et Assmaa ALAOUI<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Reconstitution de l'Espace et Développement Durable (LREDD) - Département de géographie - Université Chouaib Doukkali Avenue Jabran Khalil Jabran B.P 299-24000- El Jadida, Maroc.

<sup>b</sup>Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Ressources Naturelles (LBVRN)- Université Ibn Zohr -Faculté des sciences - B.P 8106 Cité Dakhla-Agadir, Maro

---

Soumis le : 14/01/2021

Forme révisée accepté le : 30/05/2021

Auteur Correspondant: [mouniagahlouz@hotmail.com](mailto:mouniagahlouz@hotmail.com)



**Revue  
Nature et Technologie**

<http://www.univ-chlef.dz/revuenatec>

ISSN : 1112-9778 – E-ISSN : 2437-0312

# Analyse des mesures pendulaires d'auscultation par le modèle HST : cas du barrage Béni-Haroun

Mounia GAHLOUZ<sup>a</sup>, Bachir GOURINE<sup>a</sup>, Smail GABI<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Centre des Techniques Spatiales, 1 avenue de la Palestine, Arzew, 31200, Algérie

<sup>b</sup> Université de Mouloud Mammeri, Nouvelle ville, Tizi-Ouzou, 15000, Algérie

## Résumé

La surveillance des barrages fournit des séries de mesures chronologiques issues de différents dispositifs équipant l'ouvrage. Ces mesures doivent être analysées afin de déterminer le comportement du barrage par rapport aux facteurs (pression hydrostatique, température, vieillissement...etc.) influant sur sa stabilité. Le travail présenté dans cet article, porte sur l'analyse d'un ensemble de mesures pendulaires (280 mesures environ), étalées sur une période de 16 ans (du 1er Septembre 2003 au 30 Septembre 2019), du barrage Béni-Haroun (Wilaya de Mila-Algérie) en utilisant le modèle HST ((Hydrostatique, Saisonnier, Temporel). L'application du modèle HST sur ces mesures a permis de quantifier les déplacements relatifs aux effets (hydrostatique, saisonnier et temps) d'une part et de séparer les effets réversibles (effets hydrostatique et saisonnier) de l'effet irréversible (temps) par le calcul des déplacements corrigés d'autre part. Les déplacements dus à l'effet hydrostatique sont plus importants (jusqu'à 14 mm) que ceux dus aux autres effets (ne dépassant pas les 5mm). Afin d'émettre un jugement sur le comportement du barrage, des indicateurs d'interprétation ont été calculés pour chaque effet. Les valeurs obtenues sont négligeables (de l'ordre du millième), ce qui signifie qu'aucun des trois effets ne présente un risque pour la stabilité de l'ouvrage (les indicateurs inférieurs à l'unité).

Mots-clés: Barrage; Comportement; Analyse; Mesures pendulaires; Modèle HST; Déplacements.

## Abstract

The monitoring of dams provides a series of chronological measurements from different devices installed in the structure. These measurements must be analyzed in order to determine the behavior of the dam with respect to the factors (hydrostatic pressure, temperature, aging, etc.) influencing its stability. The work presented in this article, concerns the analysis of a set of pendular measurements (280 measurements approximately), spread over a period of 16 years (from September 1, 2003 to September 30, 2019), of the Beni-Haroun dam (Wilaya of Mila-Algeria) using the HST model (Hydrostatic, Seasonal, Temporal). The application of the HST model on these measurements allowed to quantify the displacements relative to the effects (hydrostatic, seasonal and time) on the one hand and to separate the reversible effects (hydrostatic and seasonal effects) from the irreversible effect (time) by the calculation of the corrected displacements on the other hand. The displacements due to the hydrostatic effect are more important (up to 14 mm) than those due to the other effects (not exceeding 5 mm). In order to make a judgment on the behavior of the dam, interpretation indicators were calculated for each effect. The values obtained are insignificant (of the order of a thousandth), which means that none of the three effects presents a risk for the stability of the structure (indicators below unity).

Keywords: Dam; Behavior; Analysis; Pendulum measurements; HST model; Displacement

## 1. Introduction

Les barrages ont connu une grande évolution dans leur construction ainsi que par rapport à leur capacité de retenue, cela revient au développement des techniques de génie civil et la croissance démographique à travers le monde. L'Algérie pour sa part recense plus de 80 barrages en exploitation avec une capacité qui dépasse les 8 milliards de m<sup>3</sup> [1]. Ces infrastructures peuvent

être affectées par les eaux infiltrées dans le corps du barrage ainsi que dans sa fondation, ce qui présente un risque dans le cas où il n'y aurait pas de suivi et d'entretien ; c'est pour cela qu'une surveillance en continue est nécessaire.

La surveillance des barrages a pour objectif d'étudier le comportement de l'ouvrage selon les différents facteurs pouvant affecter sa stabilité, de



Ceci est un document en libre accès selon les termes de [Creative Commons Attribution License CC-BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), ce qui permet de le partager, copier, reproduire, distribuer, communiquer, réutiliser ou de l'adapter avec l'obligation de créditer son auteur.



prévenir les dégradations sur le long terme et d'assurer la sécurité et le bon fonctionnement de cet ouvrage.

Pour émettre un jugement sur le comportement d'un barrage, il faut notamment disposer de mesures continues issues des dispositifs spécifiques à la surveillance de ces ouvrages (réseaux d'auscultation géométrique, stations GNSS<sup>1</sup>, piézomètres, thermomètres, pendules, ...etc); et les analyser correctement.

## 2. Matériels et Méthodes

Outre les méthodes d'analyse, de traitement et d'auscultation utilisées dans le cadre du suivi d'un barrage, la méthode la plus répandue pour ce type d'analyse est l'utilisation du modèle HST. Conçu par l'EDF<sup>2</sup> (Electricité De France) en 1960, ce modèle permet d'analyser des séries des mesures pendulaires issues des barrages voûte. Il a été généralisé pour d'autres types de mesures et autres types de barrages [2].

Le modèle prend compte de trois effets (Hydrostatique, saisonnier, temps) et permet de corriger les observations brutes des effets réversibles (Hydrostatique, Saisonnier), afin de pouvoir caractériser les déplacements irréversibles et bien examiner le comportement de l'ouvrage au cours du temps.

Le travail réalisé porte sur l'analyse d'un ensemble de mesures pendulaires du barrage Béni-Haroun pour une période de 16 ans par le modèle HST. L'analyse consiste à calculer les déplacements relatifs à chaque effet, ainsi que les déplacements corrigés; afin de pouvoir examiner le comportement du barrage au fil du temps.

L'interprétation des résultats a été faite à travers la détermination de certains indicateurs dits d'interprétation; relatifs aux trois effets; ainsi que par le calcul du coefficient de détermination qui nous informe sur la qualité de l'analyse.

### 2.1. Description de la méthode

Le modèle d'analyse HST se base sur la détermination des déplacements relatifs aux trois effets (hydrostatique, saisonnier et temps)

L'effet hydrostatique (H) correspond à la variation du niveau de la retenue, il est représenté par une fonction polynomiale de 4<sup>ème</sup> ordre :

$$H = a_1 Z + a_2 Z^2 + a_3 Z^3 + a_4 Z^4 \quad (1)$$

où  $Z$  est la côte centrée réduite du plan d'eau  $z(t)$  à l'instant  $t$  définie par :  $Z = \frac{z(t) - \bar{z}}{\sigma}$  avec  $\bar{z}$  et  $\sigma$  la moyenne et l'écart type de la série de mesures respectivement.

L'effet saisonnier (S) correspond à l'influence des écarts de température entre saisons froides et saisons chaudes, cet effet est approximé par les deux premiers termes d'un développement en série de Fourier :

$$S = b_1 \sin(\omega_a t) + b_2 \cos(\omega_a t) + b_3 \sin^2(\omega_a t) + b_4 \sin(\omega_a t) \cos(\omega_a t) \quad (2)$$

$\omega_a = 2\pi / \Delta t_a$  étant la pulsation annuelle et  $\Delta t_a$  une durée correspondant à une année (365,25 jours par année).

L'effet temps (T) est traduit par une évolution positive ou négative (augmentation ou diminution avec le temps): dissipation des pressions interstitielles de construction, évolution de la perméabilité des matériaux ... etc. Cet effet est dit effet irréversible contrairement aux deux premiers. Il est représenté par la somme d'un terme linéaire, une exponentielle positive et une exponentielle négative du temps réduit  $\tau$  pendant la période analysée  $[t_i, t_f]$  [3].

$$T = c_1 \tau + c_2 e^{\tau} + c_3 e^{-\tau} \quad (3)$$

$$\text{avec : } \tau = \frac{t - t_i}{t_f - t_i}$$

Les termes  $a_i$ ,  $b_i$  et  $c_i$  dans, respectivement, les équations (1), (2) et (3) sont des coefficients relatifs aux modélisations des effets hydrostatique, saisonnier et temps respectivement.

On admet qu'en notant  $Y$  une valeur observée du phénomène, cette valeur est la somme de trois termes H, S et T telle que :

$$Y = H(Z) + S(\omega) + T(\tau) + \varepsilon \quad (4)$$

Le terme  $\varepsilon$  représente le résidu du modèle que l'on néglige par simplification.

Une autre façon de visualiser la tendance réversible révélée par le modèle HST (modèle de type additif) est

<sup>1</sup> GNSS: Global Navigation Satellite System

<sup>2</sup> Electricité De France : <https://www.edftrading.com/>

de calculer les données corrigées  $Y_c$ , qui correspondent aux données brutes  $Y$  corrigées des effets réversibles estimés  $H$  et  $S$  [4].

$$Y_c = Y - H(Z) + S(\omega) \quad (5)$$

Tableau 1  
Indicateurs d'interprétation (Modèle HST)

Effet	Indicateur	Sens
H	$\alpha = \frac{H(Z_{\max}) - H(\bar{Z})}{Z_{\max} - \bar{Z}}$	Évalué entre le niveau maximal et le niveau moyen pour ne pas prendre en compte les mesures à bas niveau (vidange exceptionnelle).
S	$B = \sqrt{b_1^2 + b_2^2} + \frac{1}{2}\sqrt{b_3^2 + b_4^2}$	Amplitude maximale qui serait atteinte si les effets annuels et semestriels seraient en phase ( $b_1, b_2, b_3, b_4$ sont des coefficients liés à l'équation de l'effet saisonnier).
T	$v = \frac{\Delta t_a (T_f - T_i)}{t_f - t_i}$	Vitesse d'évaluation annuelle à partir de la valeur initiale $t_i$ et la valeur finale $t_f$ de la période.

## 2.2. Zone d'étude

L'emplacement du barrage Béni-Haroun se situe au Nord de l'Algérie sur El-Oued El-Kébir, à une quarantaine de km de son embouchure dans la mer Méditerranée. Sa retenue se trouve au sud de ce dernier et se situe à 40 km au Nord Ouest de la ville de Constantine et à 350 km à l'Est d'Alger (Figure 1).

Le barrage se situe à l'extrémité amont de la gorge calcaro-marneuse de Béni-Haroun, à environ 4 km du confluent de l'oued Rhumel et de l'Oued Endja.

L'apport annuel régularisé du barrage est d'environ

435 millions de  $m^3$ , le volume total de la retenue est de 963 millions de  $m^3$  et le volume de la tranche utile entre les cotes 172 m et 200 m est de 723 millions de  $m^3$ .

Le barrage est de type poids rectiligne, construit en béton compacté au rouleau, il s'appuie sur une fondation rocheuse calcaire. Son profil type est triangulaire avec un parement amont vertical et un parement aval incliné (V/H=1, 25/1) (Figure 2).

La crête du barrage est calée à la cote 216,30 m. La hauteur de l'ouvrage est de 118 m au-dessus de la fondation et sa longueur en crête est de 710 m [6].

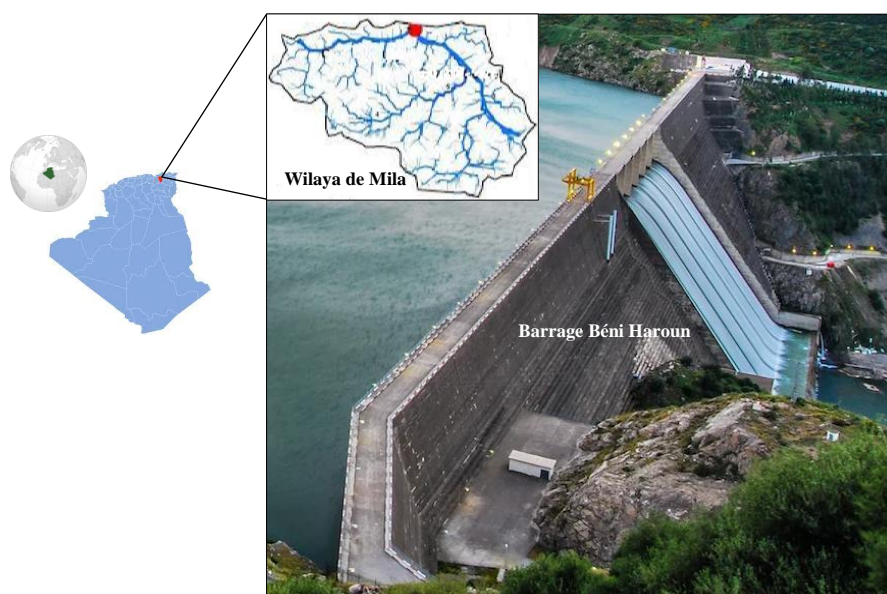


Figure 1 : Situation du barrage Beni Haroun dans le Bassin du Kébir-Rhumel (Wilaya de Mila – Algérie)

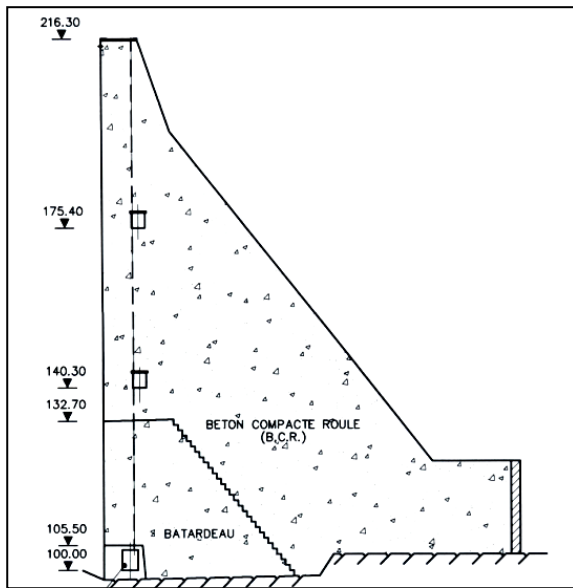


Figure 2. Profil en travers du barrage

### 2.3. Données utilisées

Le barrage est équipé de différents dispositifs d'auscultation (piézomètres, pendules thermomètres ... etc.) fournissant des séries de mesures permettant sa surveillance en continu.

Les données d'auscultation du barrage de Béni-Haroun sont fournies par [l'Agence Nationale des Barrages et Transferts \(ANBT\)](http://www.anbt.dz)<sup>1</sup>. Elles représentent des déplacements pendulaires, ainsi que des mesures de la variation du niveau de la retenue couvrant une période de 16 ans (Septembre 2003 à Septembre 2019).

En réalité le barrage est équipé de 40 pendules directs et inverses qui fournissent des mesures radiales et tangentielles.

Le pendule permet la mesure précise des déplacements horizontaux. Il est essentiellement constitué par un fil suspendu qui est centré avec précision et tendu par un poids. En vue de permettre l'amortissement d'une oscillation éventuelle du pendule, le poids tendeur du fil se trouve dans une cuve remplie d'huile [7].

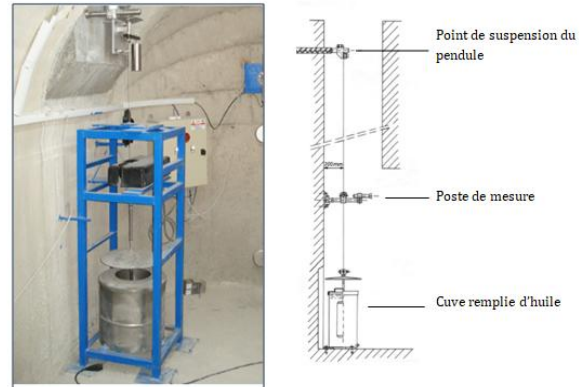


Figure 3. Image d'un pendule

### 3. Résultats et discussion

Nous disposons sur la période analysée de 278 mesures qui représentent des déplacements radiaux issus des pendules directs (11 pendules) (Figure 4).

Le calcul des déplacements relatifs à chaque effet se fait en déterminant les coefficients liés aux équations de modélisation de ces effets (Equations 1, 2 et 3) ; par régression linéaire multiple [8].

Les coefficients sont calculés via un programme élaboré sous Matlab. L'analyse permet de corriger les mesures par la soustraction des déplacements dus aux effets réversibles. Cette correction permet d'une part, de bien caractériser le déplacement irréversible qui est le facteur majeur présentant un risque sur la stabilité des ouvrages, et d'autre part de mettre en évidence les mesures anormales.

Ainsi la surveillance en temps réel et le diagnostic à long terme sont plus pertinents sur des mesures réduites que sur des mesures brutes [9]. Les figures 5a et 5b représentent les mesures pendulaires brutes et corrigées.

L'analyse permet aussi de quantifier et représenter l'effet des différents facteurs sur l'ouvrage [8], ainsi d'examiner leur influence à travers la détermination des indicateurs d'interprétation.

<sup>1</sup> [http://197.112.0.211/soudoud-dzair/index.php?action=esmap\\_vect&table=chahidgis\\_barrage&id=56](http://197.112.0.211/soudoud-dzair/index.php?action=esmap_vect&table=chahidgis_barrage&id=56)

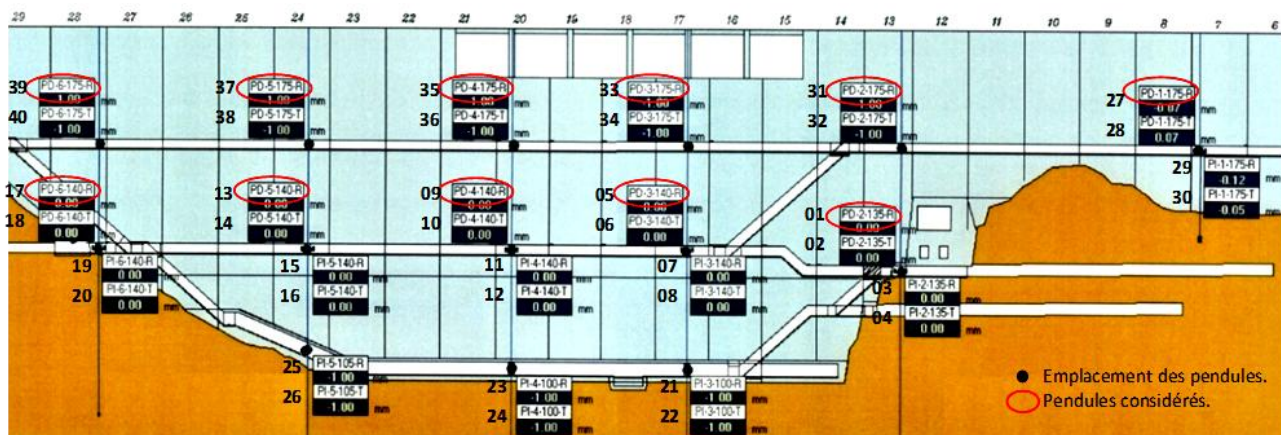
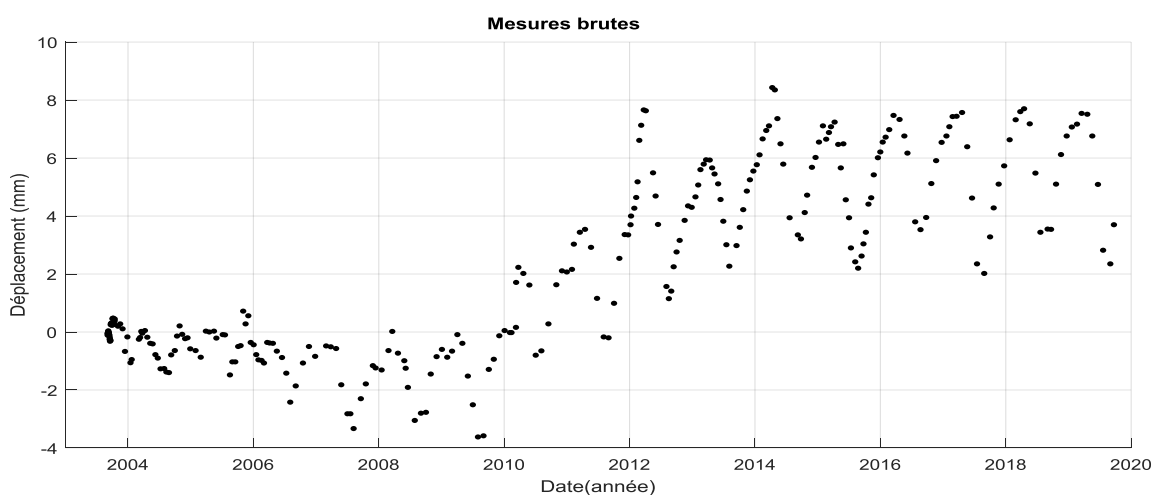
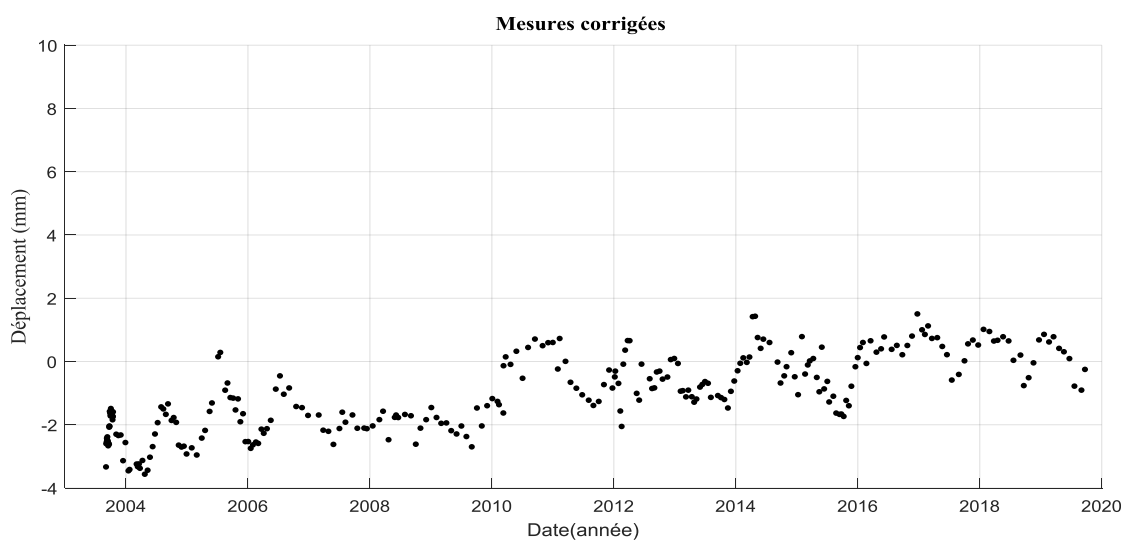


Figure 4. Emplacements et numéros des pendules du barrage Béni-Haroun



(a)



(b)

Figures 5 : Mesures pendulaires brutes et corrigées

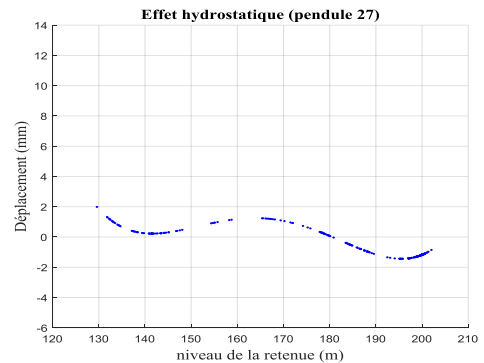
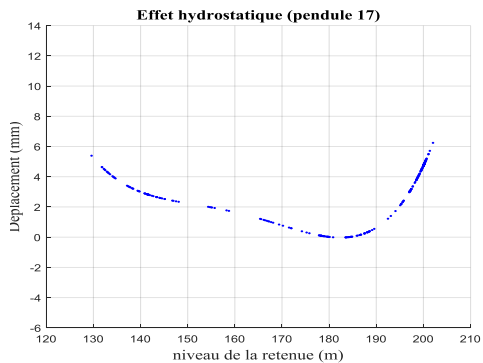
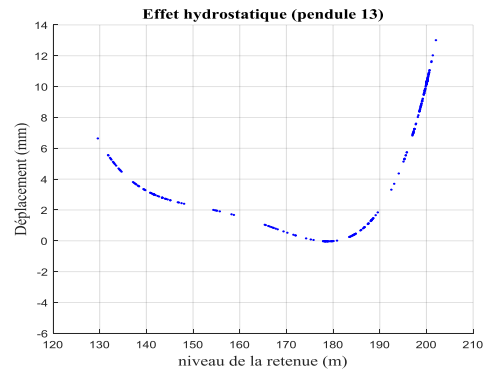
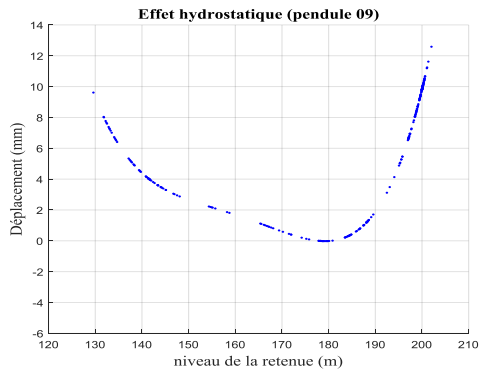
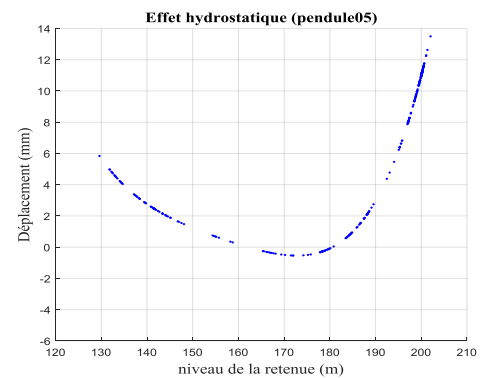
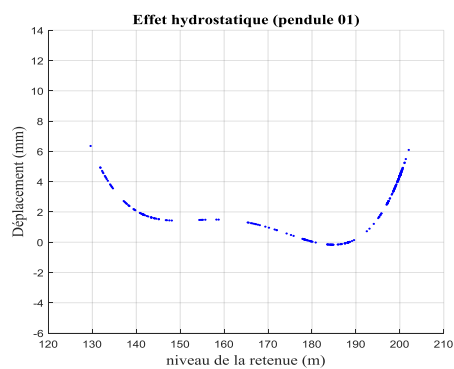


Les déplacements des différents pendules dus à l'effet hydrostatique sont représentés en fonction du niveau de la retenue (Figure 6).

On a constaté que l'ensemble des pendules donnent pratiquement la même allure et que le déplacement atteint des valeurs maximales pour les cotes 130 m et 202 m, ce qui est anormal. Une augmentation dans le niveau de la retenue engendre naturellement une augmentation dans la pression hydrostatique exercée sur le barrage et vice versa ; ce qui fait que pour un niveau d'eau élevé le déplacement du pendule sera important.

Durant la période où on a enregistré des déplacements élevés pour des niveaux de retenues bas, l'ANBT a constaté des anomalies (sous-pression élevée) pendant le suivi du comportement de l'ouvrage (Août 2003) en plus des travaux d'aménagement qui ont duré jusqu'à 2012.

Pour la période 2012-2019, on a constaté qu'il y a une corrélation entre le niveau de la retenue et le déplacement enregistré. Le remplissage du barrage durant cette période variait entre 180 et 202 mètres.



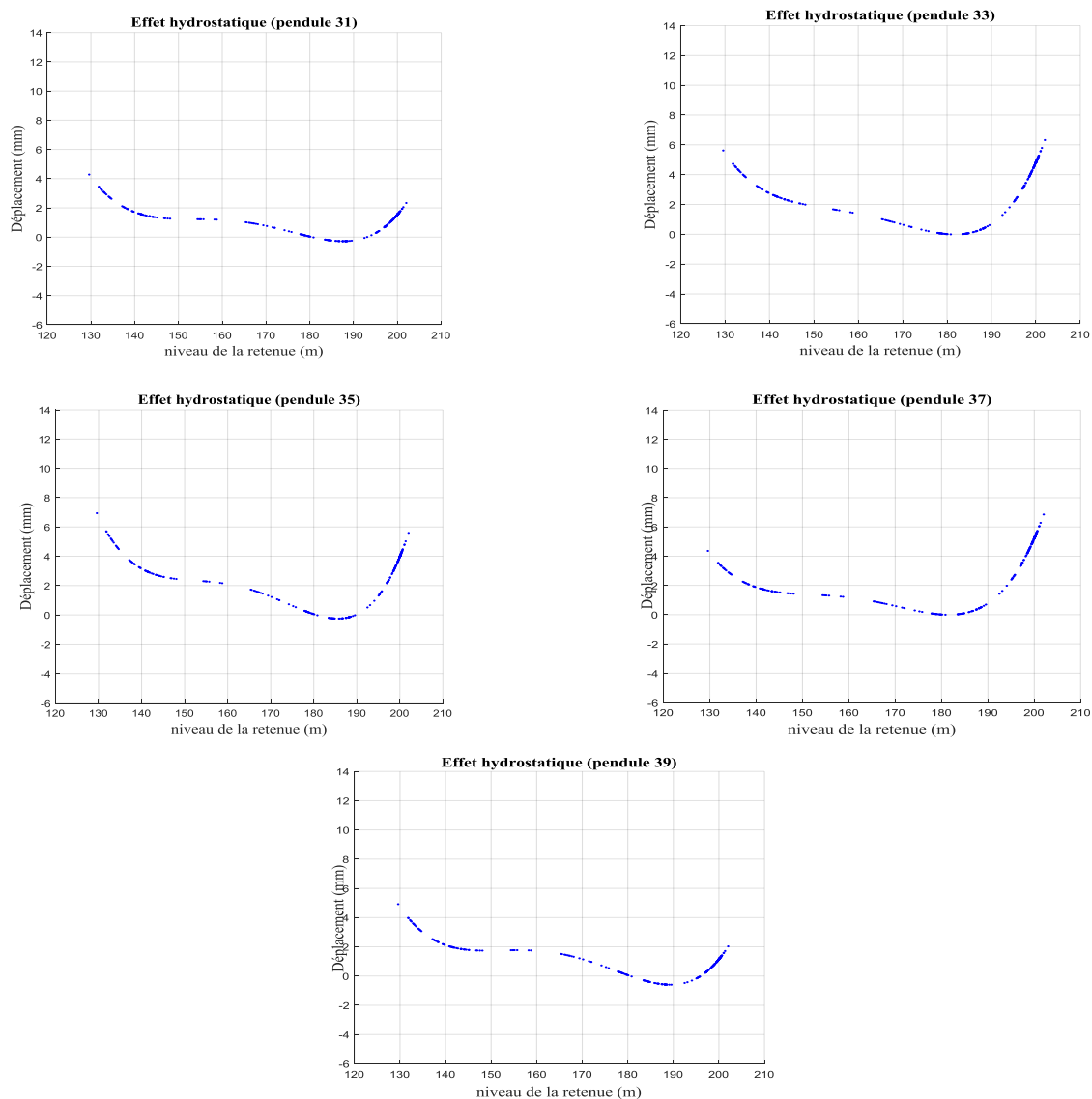


Figure 6. Représentation des déplacements dus à l'effet hydrostatique des pendules 01, 05, 09, 13, 17, 27, 31, 33, 35, 37 et 39.

D'après les valeurs de  $\alpha$  (indicateur d'interprétation lié à l'effet hydrostatique) présentées sur la figure 7, la

variation du niveau de la retenue n'influe pas sur la stabilité du barrage ( $\alpha$  proche de 0).

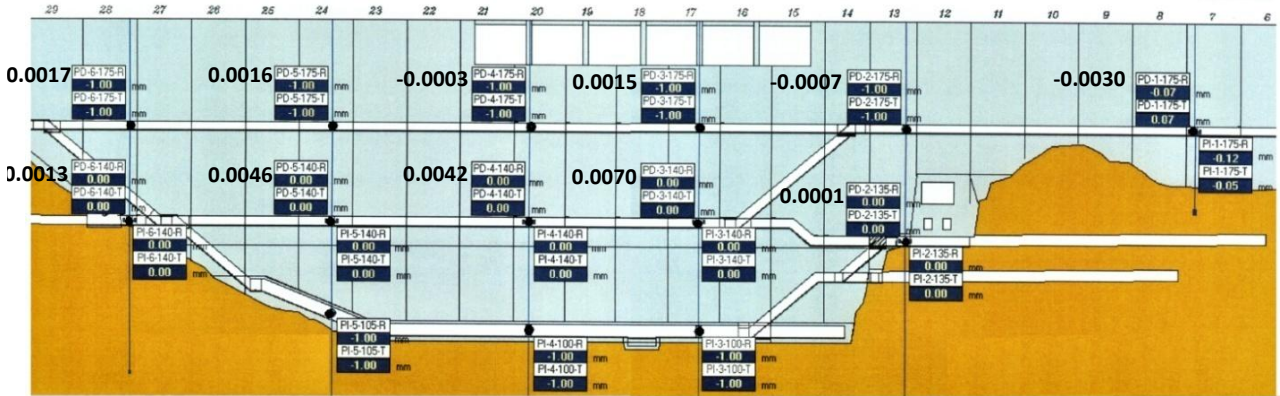
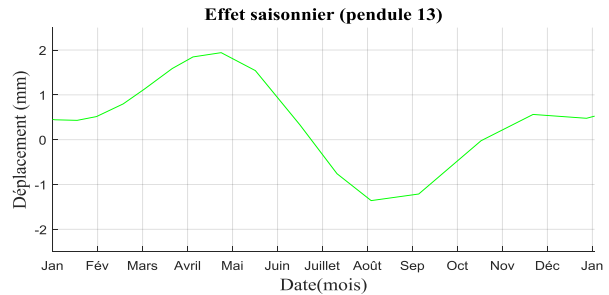
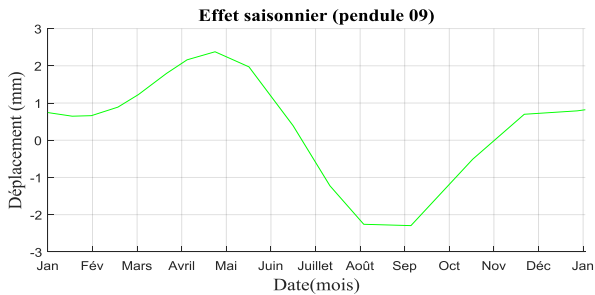
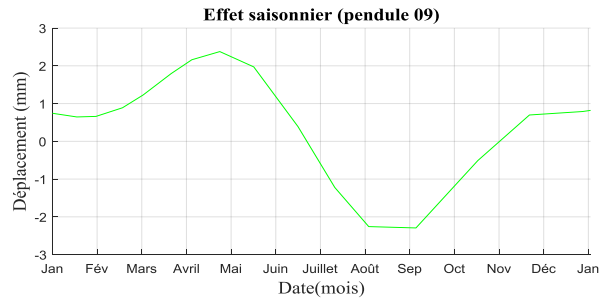
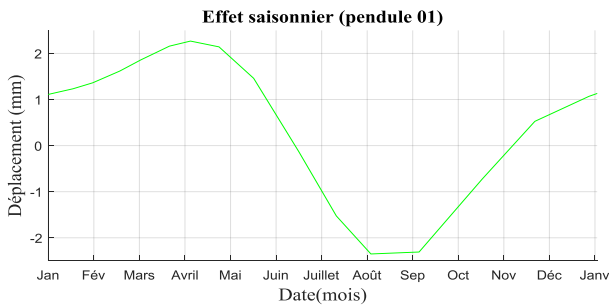


Figure 7. Valeurs de l'indicateur d'interprétation  $\alpha$

Les déplacements dus à la variation thermique (saisonnalité) sont représentés dans la figure 8 en fonction du mois de l'année.

L'effet saisonnier déterminé par le modèle HST permet de quantifier les déformations d'origine thermique [8], en effet on a remarqué que le mur se déplace vers l'aval dès que la température commence à diminuer (vers septembre), et se déplace vers l'amont lorsque la température augmente (à partir du mois d'Avril); sauf que ces déplacements ne sont pas significatifs et ne représentent aucun risque sur la stabilité du barrage car les valeurs du facteur B (indicateur d'interprétation lié à l'effet saisonnier) sont presque nulles (Figure 9). Ce phénomène a été remarqué

dans le cas d'un barrage nommé A, dont les données sont analysées par L'EDF ; où ils ont constaté qu'à partir de mi-janvier à la fin Juillet la crête de la clef du barrage se déplace de 13 mm vers l'amont et à partir du mois d'Août le barrage repart vers l'aval sous l'effet de la diminution de la température [9] ;



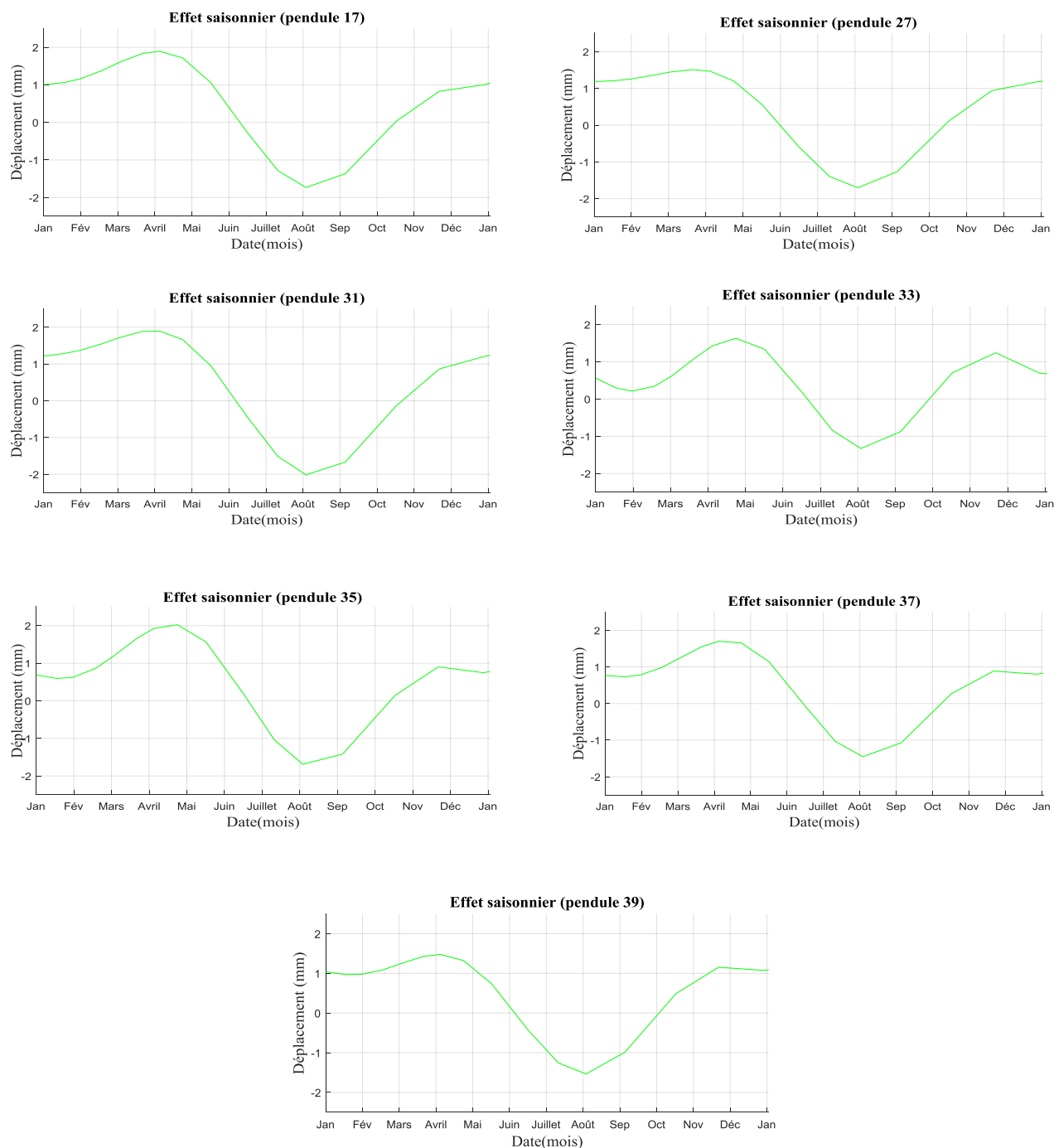


Figure 8. Représentation des déplacements dus à l'effet saisonnier des pendules 01, 05, 09, 13, 17, 27, 31, 33, 35, 37 et 39.



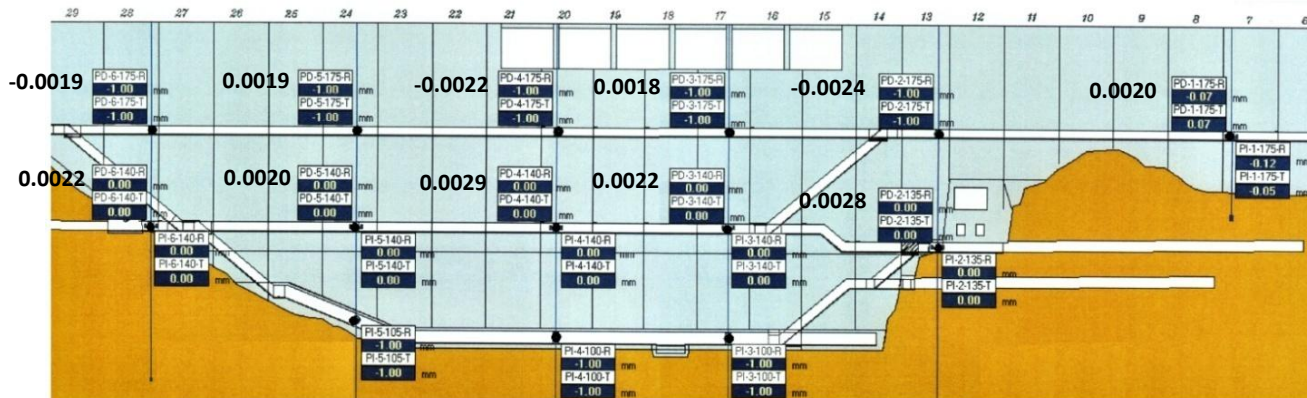


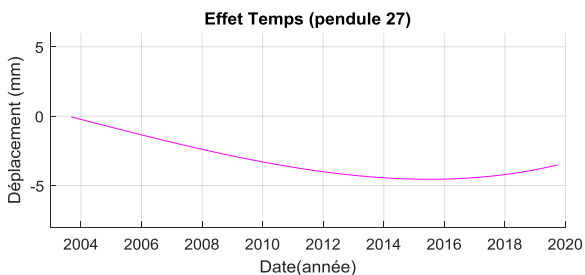
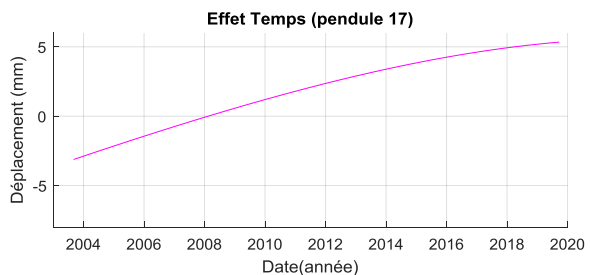
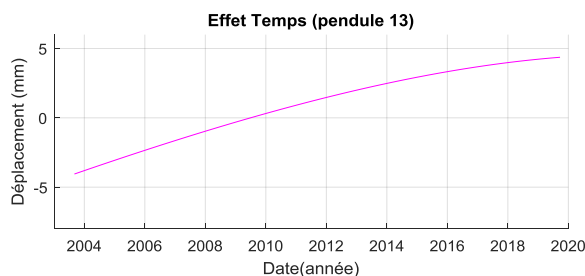
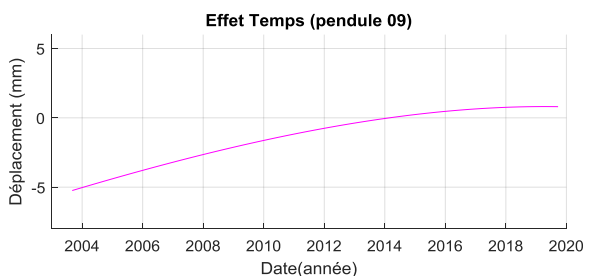
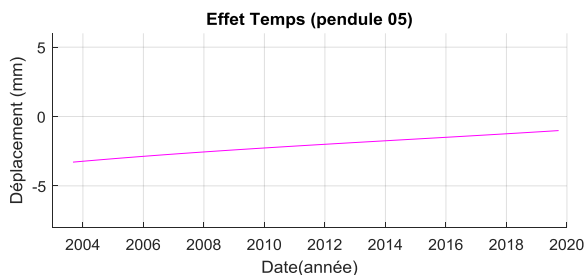
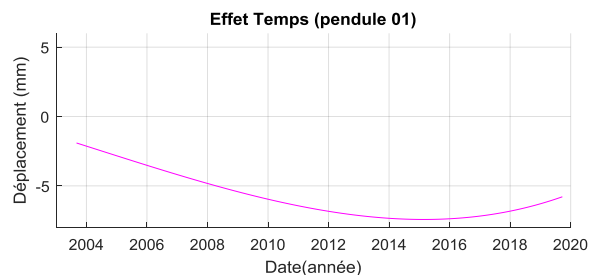
Figure 9. Valeurs de l'indicateur d'interprétation  $\beta$

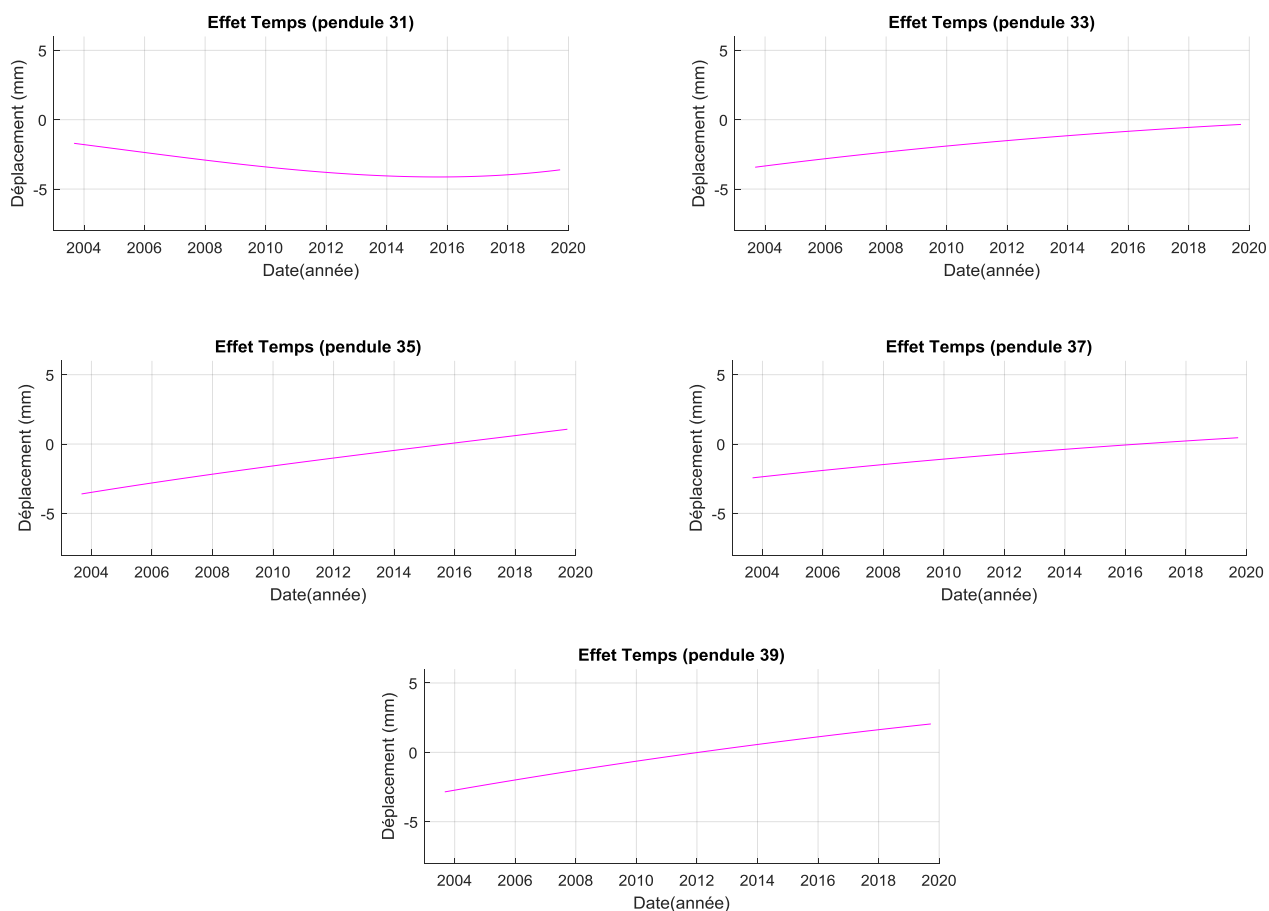
L'effet temps est illustré par les courbes des déplacements en fonction de la date (Figure 10).

On remarque deux tendances différentes ; celle qui correspond aux pendules 01, 27 et 31 et celle qui correspond aux autres pendules (05, 09, 13, 17, 33, 36,

37 et 39).

Les valeurs de l'indicateur d'interprétation  $v$  relatif à l'effet irréversible (temps), sont presque nuls ce qui signifie que le barrage ne présente aucun effet irréversible (Figure 11).





Figures 10. Représentation des déplacements dus à l'effet temps des pendules 01, 05, 09, 13, 17, 27, 31, 33, 35, 37 et 39.

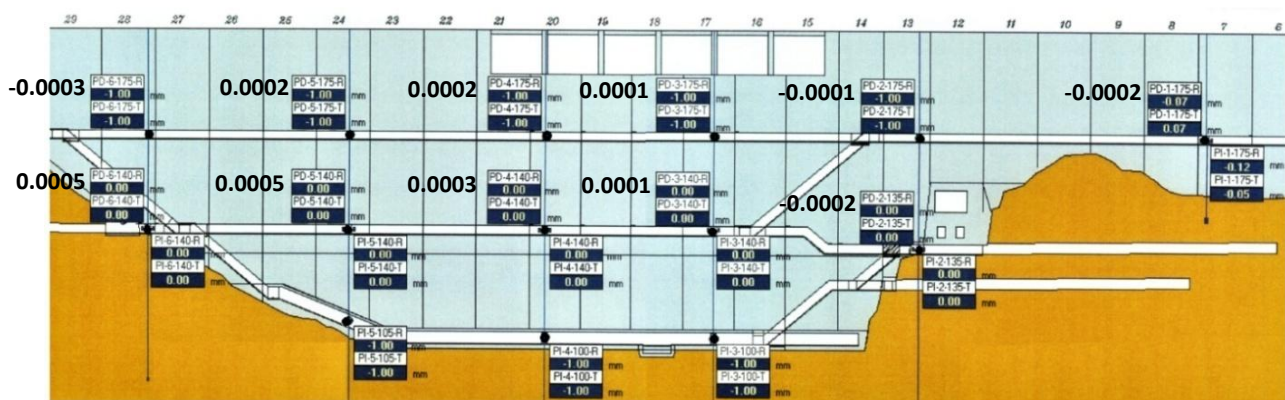


Figure 11. Valeurs de l'indicateur d'interprétation v

La qualité d'une analyse statistique dépend de la valeur du coefficient de détermination  $R^2$  qui est le rapport entre les variations expliquées par le modèle et les variations totales des mesures faites sur les instruments.

Ce coefficient est compris entre 0 et 1 ; plus  $R^2$  est proche de 1, meilleur est l'adéquation. En pratique, une analyse est de bonne qualité lorsque le  $R^2$  est au moins de l'ordre de 0,8 [8].

Le calcul des coefficients  $R^2$  liés à l'ensemble des

pendules analysés en utilisant le modèle HST montre que l'analyse est de bonne qualité pour tous les

pendules à l'exception du pendule 01 dont la qualité est jugée médiocre ( $R^2=0.778$ ) (Figure 12).

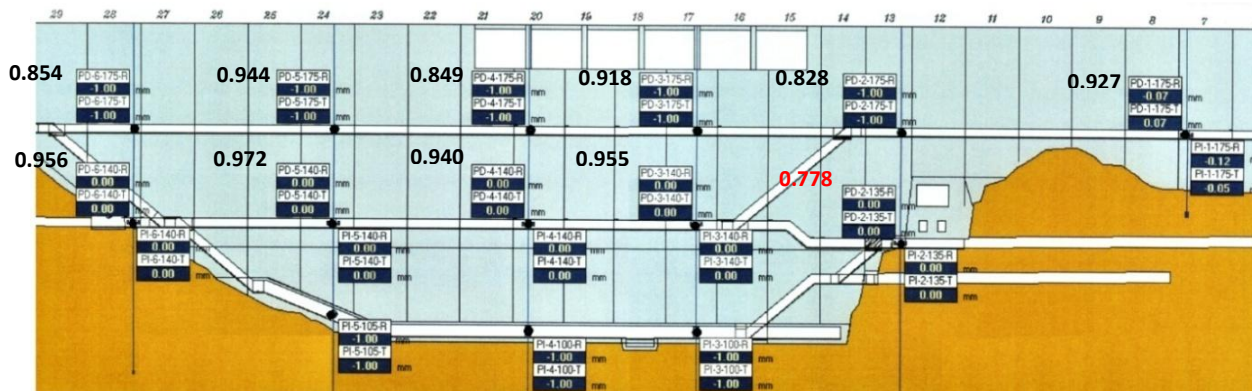


Figure 12. Valeurs du coefficient de détermination  $R^2$

Les différentes valeurs relatives aux coefficients d'interprétation obtenues durant cette analyse sont reportées sur le tableau suivant :

Tableau 2.

Valeurs des indicateurs d'interprétation relatifs au modèle HST

Pendule	$\alpha$ (effet H)	B (effet S)	$\nu$ (effet T)	$R^2$
01	0,0001	0,0028	-0,0002	0,778
05	0,0070	0,0022	0,0001	0,955
09	0,0042	0,0029	0,0003	0,940
13	0,0046	0,0020	0,0005	0,972
17	0,0013	0,0022	0,0005	0,956
27	-0,0030	0,0020	-0,0002	0,927
31	-0,0007	-0,0024	-0,0001	0,828
33	0,0015	0,0018	0,0001	0,918
35	-0,0003	-0,0022	0,0002	0,849
37	0,0016	0,0019	0,0002	0,944
39	-0,0017	-0,0019	-0,0003	0,854

#### 4. Conclusion

Les méthodes d'analyse statistique des mesures d'auscultation des barrages sont utilisées depuis plusieurs années. La simplicité et la flexibilité de ces modèles ont en fait des outils puissants de représentation graphique et d'interprétation des mesures pour suivre le comportement de l'ouvrage et détecter les phénomènes anormaux.

L'application du modèle HST sur les séries de mesures de déplacements pendulaires du barrage de

Béni-Haroun a permis d'une part de séparer les effets réversibles (effets hydrostatique et saisonnier) pour mieux comprendre le comportement de l'ouvrage à chacun de ces effets et de bien quantifier les déformations relatives, et d'autre part, de définir les déplacements irréversibles (effet de vieillissement), en éliminant les mesures anormales pouvant entraver le diagnostic. D'après l'analyse des résultats de l'application du modèle HST et vu les valeurs des

indicateurs d'interprétation obtenus, on peut dire que le barrage est en bon état. Les trois effets (hydrostatique, temps et saison) n'influencent pas sur la stabilité de l'ouvrage. Particulièrement il n'y a pas de déplacements irréversibles affectant la structure.

En perspectives, cette thématique reste ouverte et le travail peut être étendu à l'étude du comportement du barrage par rapport à l'effet thermique en y appliquant le modèle HSTT (ajout de l'effet thermique) qui tient compte des mesures de la température de l'air et de développer les aspects relatifs la prédiction du comportement d'un barrage à court et moyen termes.

## Références

- [1] ANBT (2019). <http://www.soudoud-dzair.com/>
- [2] Bonelli S., Analyse retard des mesures d'auscultation des barrages. Revue française de Géotechnique, 108 (2004): 31-45. <https://doi.org/10.1051/geotech/2004108031>
- [3] Gahlouz. M (2020). « *Analyse et interprétation des données d'auscultation des barrages par le modèle HST (application au barrage Bénie Haroun)* ». Mémoire de Master en Géotechnique et environnement. Université de Mouloud Mammeri (Tizi-Ouzou). Disponible en ligne : <https://dl.ummo.dz/handle/ummo/12053>
- [4] De Bigault De Granrut. M (2019). « *Analyse et interprétation de la pression de l'eau en fondation des barrages-voûtes à partir des mesures d'auscultation* ». Thèse de doctorat. Université Grenoble Alpes ; France. Disponible en ligne : <https://www.google.com/url?client=internal-element-cse&cx=012684331380167808104:oe5oj--md1a&q=https://www.theses.fr/2019GREAI048.pdf&sa=U&ved=2ahUKEwjfkdzcxNDwAhWqO-wKHcy-AJgQFjAAegQIDRAC&usq=AOvVaw1BO6PLx7ycxv3xwnXbdNc2>
- [5] Bonelli. S, Tourment R., Felix H. (2003). Analysis of earth dam monitoring data. Séminaire Franco/Polonais, Cemagref et Université de Polytechnique de Cracovie. PP 133-150
- [6] ANBT (2017). Fiche technique du barrage Béni-Haroun
- [7] Comité Suisse des Barrages (2005). Dispositifs d'auscultation des barrages, partie 03 : Appareils et méthodes de mesure. Edition Avril 2005. Disponible en ligne : [http://www.swissdams.ch/fr/publications/publications-csb/2005\\_Dispositif\\_auscultation-Part\\_3%20\(complete\).pdf](http://www.swissdams.ch/fr/publications/publications-csb/2005_Dispositif_auscultation-Part_3%20(complete).pdf)
- [8] Royet. P, Felix. H. et Hoonakker M, (2012). Les mesures d'auscultation: Principes et outils. Rapport d'auscultation du Comité Français des barrages et des réservoirs. Disponible en
- ligne sur : [https://www.barrages-cfbr.eu/IMG/pdf/col2012-2-01-mesures\\_d\\_auscultation-principes\\_et\\_outils.pdf](https://www.barrages-cfbr.eu/IMG/pdf/col2012-2-01-mesures_d_auscultation-principes_et_outils.pdf)
- [9] Penot I., Fabre J-P., Daumas B., Analyse et modélisation du comportement des ouvrages de génie civil par la prise en compte des températures de l'air : Méthode HST Thermique. 23<sup>ème</sup> congrès des grands barrages (CIGB ICOLD), Braxilia, Mai 2009.





# An investigation of the practices of veterinarians and breeders in the prevalence of antibiotic resistance in poultry farms in Algeria.

Yahya MERAZI <sup>a,\*</sup>, Kheira HAMMADI<sup>a</sup>, Firdaous Faiza FEDOUL<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratory Educational Microbiology, Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem, B.P. 188, 27000, Algeria.

<sup>b</sup>Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Djillali Liabes University, Sidi Bel Abbès, B.P. 89, 22000, Algeria.

## Abstract

The practices adopted by the breeder and the veterinarian are factors that influence resistance to antibiotics in poultry farms. The study aims to determine some of the applications of the veterinarian and the breeder. A survey was carried out among a group of 237 veterinarians in Algeria in the form of an interview and an online questionnaire. The pathologies affect the digestive system 37.87% and the respiratory system 35.95%, respecting the recent renewal of the litter 51.9%, food distribution conditions 51.48%, drinking water 45.15%, and ventilation 23.21%. Most veterinarians base their diagnosis on visual observation of symptoms and an autopsy. It only intervenes after a worsening of symptoms into 56.12%. The broad-spectrum antibiotic prescribed 56.54%. The case in which the first treatment was not effective 83.54%. The veterinarian is summoned more than once in the same herd 42.19% is that of 2 times per group. The treatment failure is resolved either by 28.27% of prolonging the duration of treatment or by 20.68% by increasing the dose. The human causes of antibiotic resistance in broiler chickens were identified; this allows proposing preventive measures, managing and reducing the risks of antibiotic resistance.

Keywords: Investigation; Veterinary; Breeder; Antibiotic; Antibiotic Resistance.

## 1. Introduction

Poultry farming is undeniably the branch of animal production that has recorded a remarkable development in Algeria in recent years [1]. The high prevalence of poultry diseases may be attributed to the low level of biosecurity, low vaccination coverage, unscientific poultry management practices, and almost absent poultry veterinary interventions across the country, particularly in the extensive poultry production system [2]. Antibiotics are unfortunately still sometimes used with a preventive purpose to treat healthy animals likely to be exposed to a risk factor for an infectious disease. All these methods of antibiotic use promote the selection of resistant bacteria in the digestive microbiota [3, 4]. The veterinarian is a major player in reducing the use of antibiotics through his skills in diagnosis and definition of a solution adapted to each animal health situation [5], He must give himself the means to make a reasoned choice based on his epidemiological knowledge, his sense of diagnosis and on additional examinations, particularly bacteriological

[6]. The breeder uses antibiotics, according to the expected benefit. He is at the center of the decision, as he manages first-line the use of antibiotics for sick animals, and also through husbandry practices which can be risk factors for the onset of the disease [7].

The present study aims to conduct a field survey on the use of antibiotics in broiler chickens. Respondents are private and public, veterinarians. It is considered a veterinarian is able to fully understand the situation of the breeder in the face of the problem of antibiotic resistance, thanks to the skills acquired in his field of specialization and to the experience accumulated. The survey covers the state of health of poultry, the production practices of breeders, veterinary practices in terms of diagnosis and use of antibiotics.

## 2. Materials and methods:

Our survey targeted practicing veterinarians from Sidi Bel Abbès (North-Eastern) and other regions of Algeria, dealing with broilers, whether on an occasional or daily basis. By a questionnaire, where we



relied on both the interview and the online questionnaire.

The purpose of this survey is to provide a source of information on the situation and practices surrounding broiler farm.

The investigation is based on the recording of three axes, are necessary for our study only, the state of health of the poultry, the practices of the breeders in the production, the veterinary practices in the diagnosis and the use of antibiotics, the emergence of antibiotic resistance in bacteria.

### 3. Results

#### 3.1. Frequent pathologies

In poultry farms, different types of pathologies have been encountered. The pathologies most often treated are digestive system 37.87%, respiratory system 35.95%, nutritional 17.28%, the nervous system 4.71% and locomotor system 4.19% (Figure 1).

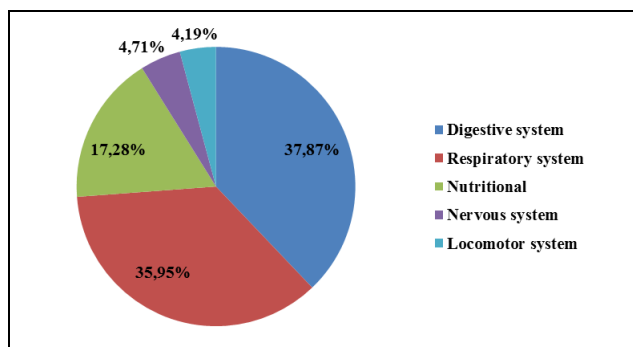


Figure 1: The main pathologies encountered

#### 3.2. Digestive and respiratory pathologies

##### 3.2.1. Digestive

According to the respondents, four main pathologies with clinical digestive expression are frequent: Coccidiosis, Colibacillosis, Salmonellosis and Enteritis with a rate of 89.45%, 73.42%, 68.35%, 68.35% respectively (Figure 2).

##### 3.2.2. Respiratory

Respondents reported a multitude of important respiratory conditions: Mycoplasmosis, Bronchitis,

Chronic respiratory, Laryngo-tracheitis, pneumonia, avian Flu with a rate of 78.90%, 73.42%, 71.73%, 61.18% respectively (Figure 2).

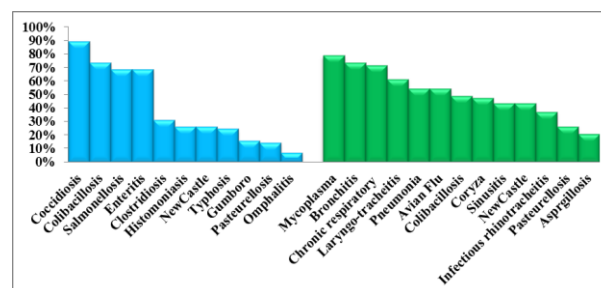


Figure 2: Types of diseases suspected in digestive and respiratory syndrome

#### 3.3. Microbial contamination depending on the age of the chicken

The growth phase is characterized by a level of important bacterial infections 48.82%, compared to the starting phase of 33.33% and finishing phase 17.85% (Figure 3).

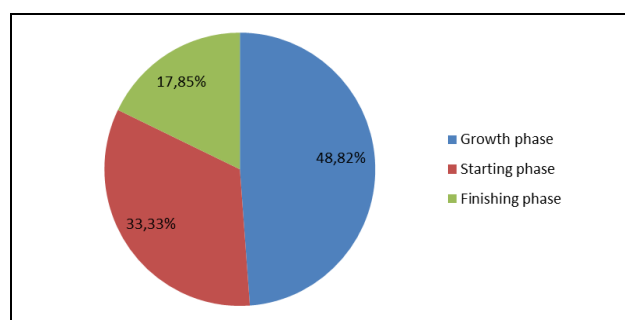


Figure 3: The microbial contamination during the chicken breeding phase

#### 3.4. The state of stored food:

Field surveillance allows veterinarians to examine the condition of stored food and to judge its quality with the naked eye. The results are 41.43%, 22.12%, 19.94%, 16.51% for food stored a little damp, of good quality, moldy, of poor quality respectively (Figure 4).

**16 An investigation of the practices of veterinarians and breeders in the prevalence of antibiotic resistance in poultry farms in Algeria**

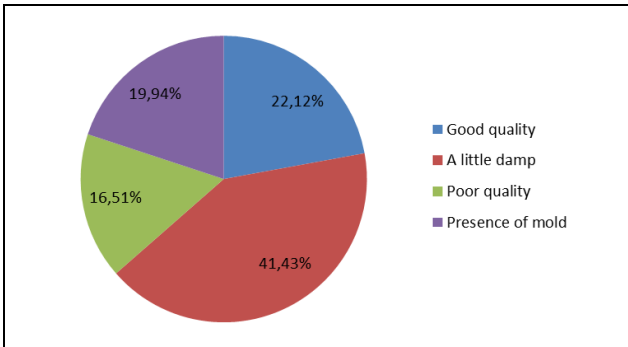


Figure 4: The state of stored food

**3.5. The quality of the litter in the storage area and on the poultry living area**

More than half of the veterinarians consider that the litter was wet in the storage area and the breeding unit

of 52.99%, 51.06% respectively. While dust characterizes the litter in the storage area and the breeding unit of 25.21%, 30.21% respectively.

Mould characterizes the litter in the storage area and the breeding unit 23.08%, 19.57% respectively (Figure 5).

The litter is of good quality represented in the storage area and the breeding unit 17.09%, 22.98% respectively.

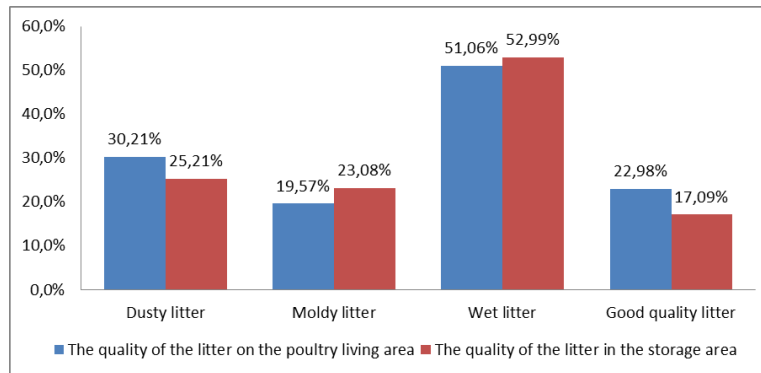


Figure 5: The quality of the litter in the storage area and on the poultry living area

**3.6. The ambient components of buildings**

Any component of the atmosphere in livestock buildings can have an impact on health, either directly or indirectly. The respected criteria which define the

ambient conditions are given as a percentage by the surveys: The feeding 74.26%, Recent litter renewal 51.9%, Feed distribution conditions 51.48%, The temperature 48,95%, The lighting 45.99%, Drinking water 45.15%, The ventilation 23.21% (Figure 6).

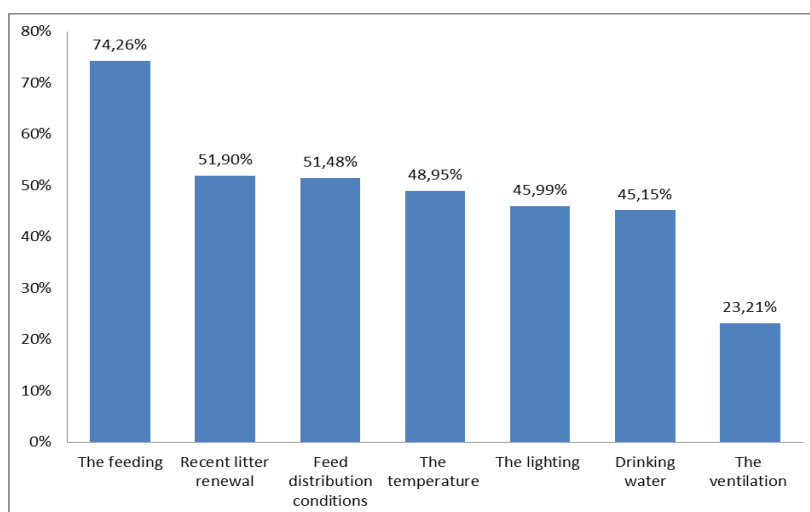


Figure 6: The respect of the conditions of breeding of hens by the breeder

### 3.7. Diagnostic means

In the veterinary field, diagnostic methods are essential for a simple, clear and precise diagnosis. All veterinarians rely on visual observation of symptoms in sick chickens. While 90.30% of veterinarians rely on the necropsy and visual observation of symptoms, while 14.77% rely on the diagnosis by referring to the laboratory to determine the type of germs causing the disease (Figure 7).

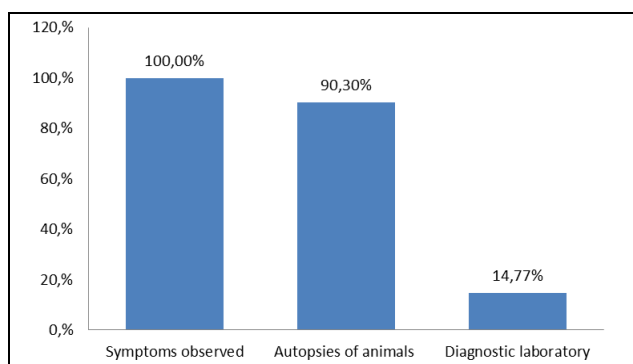


Figure 7: The veterinary means available to establish a diagnosis

### 3.8. The intervention phase

Veterinarians are solicited as soon as chickens show the first signs of disease 43.88%, while veterinarians who are not solicited only after symptoms worsen 56.12% (Figure 8).

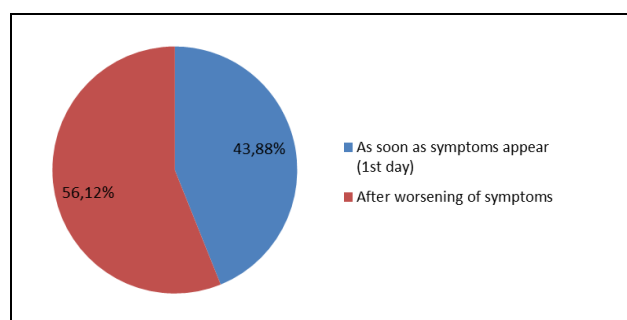


Figure 8: The generally requested time of veterinarian

### 3.9. Control of hygienic conditions

87.34% of the response cases state when implementing the treatment they perceive hygienic conditions in poultry farms (Figure 9).

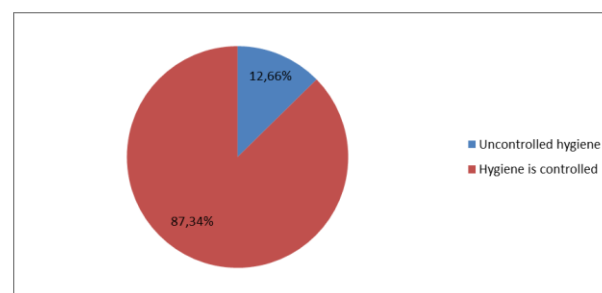


Figure 9: Control of hygienic conditions by veterinary

### 3.10. Determine the method of counting chickens for treatment

Veterinarians count the number of chickens in the barn and determine the total weight to determine the

dose needed for the flock. Weight a group of chickens to generalize it to the flock 36.71%. Estimated to the naked eye 25.74%. Consultation of the 21.52% broiler weight and mortality monitoring document. The document is prepared by the breeder at the start of raising the chickens. Use of the information provided orally by chicken farmers 9.28%. Count all the chicken 6.75% (Figure 10).

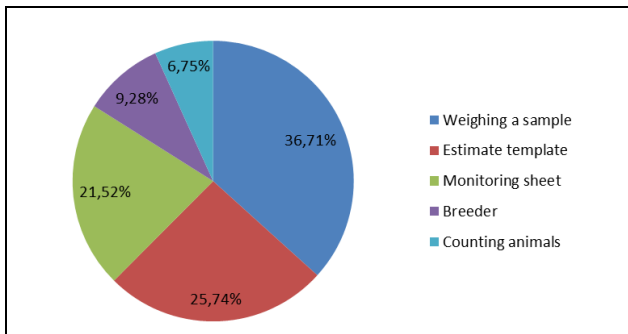


Figure 10: Method of counting chickens for treatment

### 3.11. Prescribing antibiotics:

In case of the endurance of the symptoms after the first treatment of pathology, veterinarians generally prescribe to breeders another molecule of antibiotic or make a combination of antibiotics according to the forecast of the healer.

The conduct of the respondents varies between the prescription of a broad-spectrum antibiotic adopted by 56.54% of the respondents, the prescription of a combination of antibiotics adopted by 43.46% of the respondents (Figure 11).

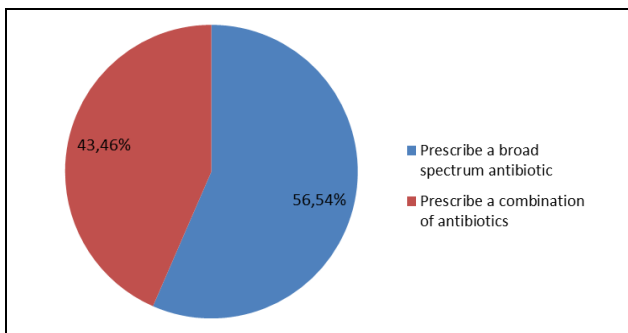


Figure 11: The conduct of the veterinarian

### 3.12. Managing the preparation of the drugs to be distributed

In regards to preparing the quantity of medicine to be distributed to animals, 83.54% of those surveyed said that they proceed a prepare the daily amount of antibiotic to be administered. 16.46% of them proceed a prepare the total amount sufficient for the duration of the treatment.

It seems that almost all practitioners are aware of the disadvantages that can bring long periods of the drug solution and its consumption by animals (Figure 12).

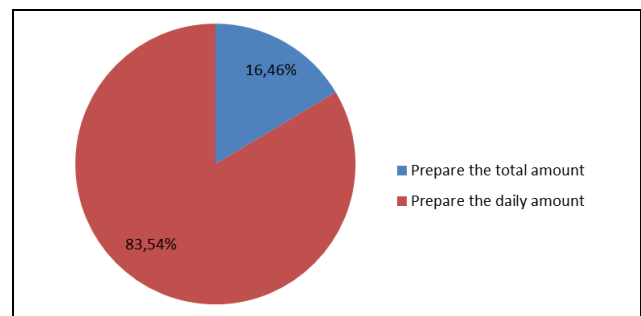


Figure 12: The method of administering the drug in drinking water

### 3.13. The person responsible for the administration of antibiotics

The breeder who administers the drugs, according to veterinary guidelines 70.04%. The veterinarian himself who, on the occasion of his visit to the holding in which disease had declared administered the product on the spot 29.96% (Figure 13).

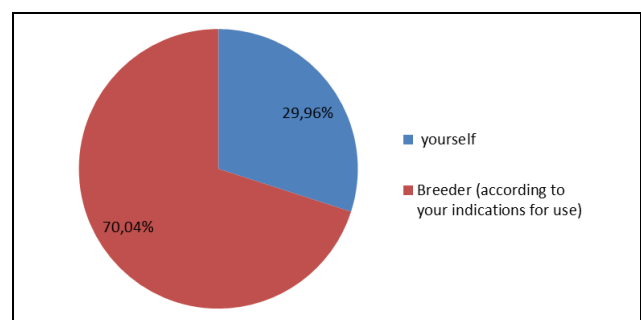


Figure 13: The drug administration manager



### 3.14. The route and the means of antibiotic administration:

The oral route is the only route of antibiotic administration. The means of administration of the antibiotic is reserved only for drinking water.

### 3.15. A first treatment failure

83.54% of those surveyed said they had encountered cases during which the first treatment did not give results (Figure 14).

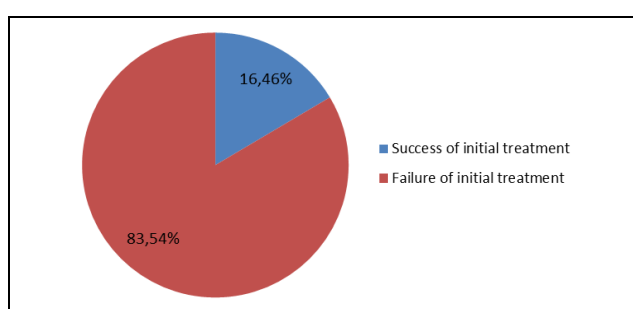


Figure 14: The frequency of antibiotic therapy failures

### 3.16. The interventions thérapeutic

79.32% of interviewees affirm that cases of therapeutic failure are frequent in the field, and this is what makes them summoned more than once to the same flock (Figure 15).

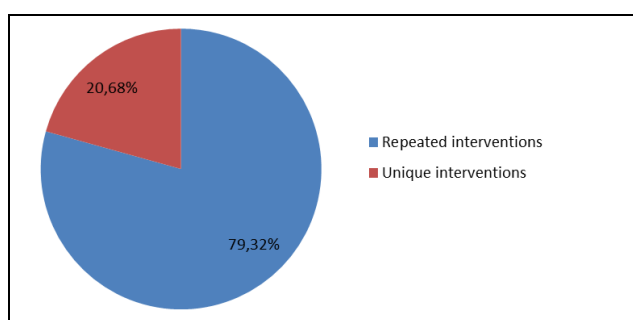


Figure 15: Therapeutic interventions

### 3.17. Frequency of therapeutic interventions

According to surveys, the same group of animals can be called several times for several pathological reasons. The respondents confirm their intervention in the same band, 22.36% from 1 time by the band, 42.19% from 2 times by band, 14.77% from 3 times by

band. While 20.68% of the respondents confirm not their intervention in the same band (Figure 16).

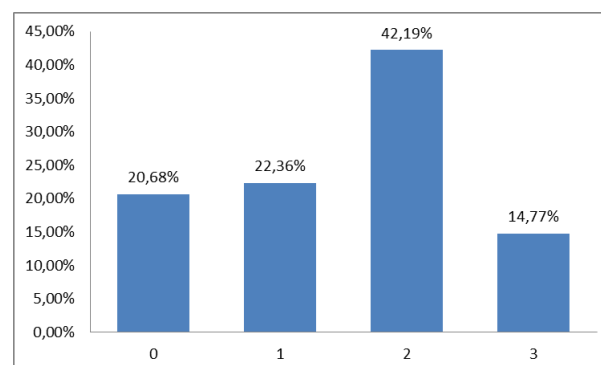


Figure 16: The frequency of therapeutic interventions

### 3.18. Management of antibiotic therapy failures

If symptoms persist after the first treatment of pathology, veterinarians administered different attitudes: 28.27% decide to extend the duration of the same treatment, 20.68% increase the dose of the same treatment, 18.99% prescribe another molecule in the case of persistence, 17.72% prescribe a combination of antibiotics, and 14.35% use the diagnostic laboratory.

Experience has shown that for certain antimicrobial active substances, higher dosages than those indicated in the approved package leaflet must be chosen to obtain sufficient efficacy (Figure 17).

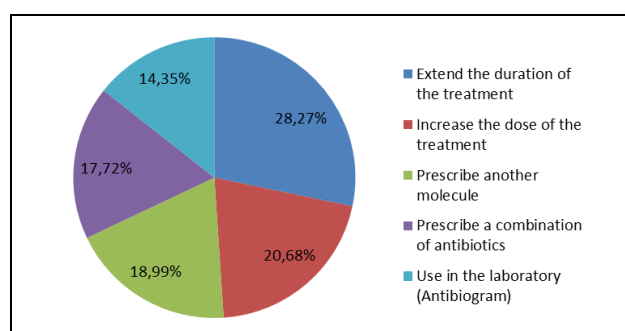


Figure 17: The attitude of a veterinarian in the face of antibiotic therapy failures after the first treatment

### 3.19. Stopping treatment of the antibiotic

81.86% of the veterinarians confirm a stop of treatment at the end of the recommended quantity of the drug, while 18.14% stop administering the drug as soon as the symptoms disappear even before the end of the indicated duration (Figure 18).

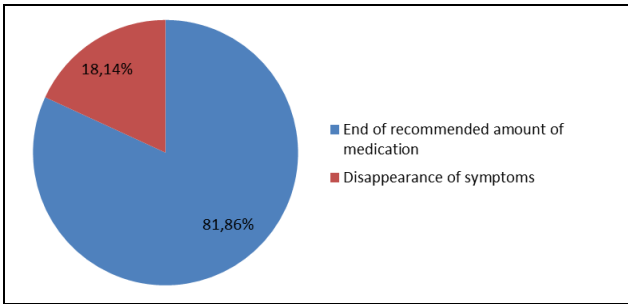


Figure 18: The moment to stop treatment

### 3.20. Contact with the regional laboratory (antibiogram)

Diagnostic laboratories are not a diagnostic confirmation tool for 74.68% of respondents, while 25.32% are attached to the regional veterinary laboratory (Figure 19).

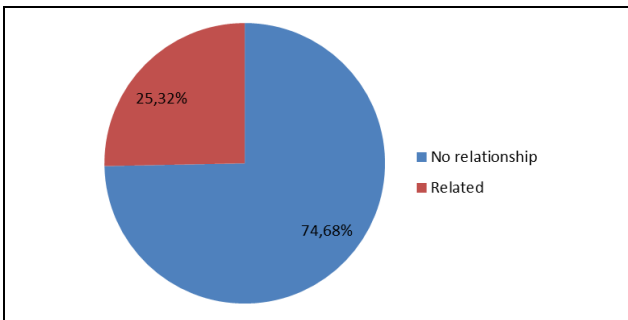


Figure 19: The relationship with the regional laboratory

### 3.21. The veterinarian's relationship with the client after the procedure

The relationship of the veterinarian with the breeder after the treatment is essential to monitor the status of the treatment. In addition to knowing the success of the treatment method.

Most veterinarians 87.76% are in contact with the breeder after the treatment. While 12.24% of vets do not contact the breeder after the treatment period (Figure 20).

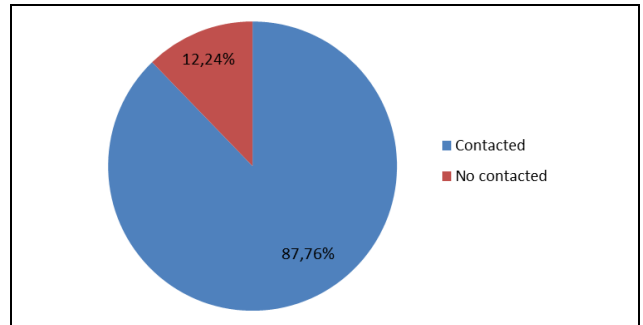


Figure 20: The contact with the customers after the start of treatment

### 3.22. The rate of use of antibiotics:

The rate of use of antibiotics by veterinarians during therapeutic interventions in poultry farms, 1 to 100% of all drug classes. The high percentage is given of 31.65% of respondents who use antibiotics from 40 to 60%, then 43.46% use the antibiotic from 1 to 40%, 21.52% declare their use to antibiotics from 60 to 80%, finally, the lowest percentage is 3.38% of respondents who use antibiotics from 80 to 100% (Figure 21).

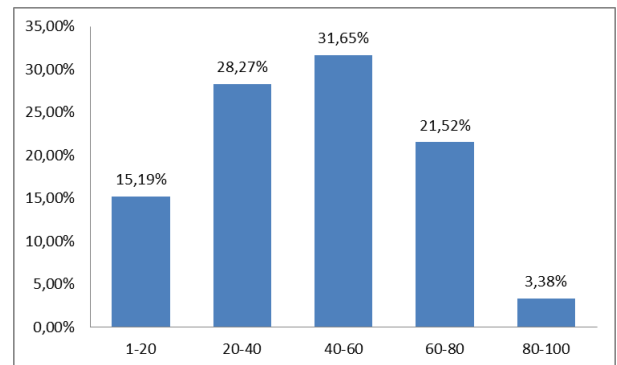


Figure 21: The approximate rate of antibiotic use

### 3.23. The effect of antibiotics

Depending on the dominant clinical, digestive or respiratory manifestations, the range of antibiotics used and their efficacy evaluation by veterinarians is represented in figure 22.

The following antibiotics have an efficacy of more than greater than 50% : Amoxycillin 75.95%, Tylosin 56.96%, Colistin 56.12%, Enrofloxacin 54.85%, Anti coccidian 51.90%.

While the Doxycycline 42.62%, Oxytetracycline 41.35%, Erythromycin 40.93%, Ampicilin 37.97%,

Trimethoprim 36.71%, Sulfadiazine 30.38% show good effectiveness on the ground varies between 30 to 50%.

While antibiotics: Neomycin 29.11%, Tilmicosin 29.11%, Sulfadimethoxine 27.85%, Flumequine 27.43%, Sulfadimidine 23.21%, Spectinomycin 21.10%, present a slightly poor efficacy on the field, varies between 20 to 30%.

But antibiotics: Gentamycin 19.83%, Difloxacin 19.83%, Sulfaquinoxaline 17.30%, Josamycin 13.92%,

Chlortetracycline 13.50%, Oxolinic acid 13.08% present effectiveness badly to present a slightly poor efficacy in the field, varies between 10 to 20%.

Antibiotics remain: Ceftiofur 9.70%, Tiamulin 7.17%, Dihydrostreptomycin 5.49%, Fosfomycin 2.95%, Framycetin 2.95% which have very poor efficacy in the field inferior at 10%.

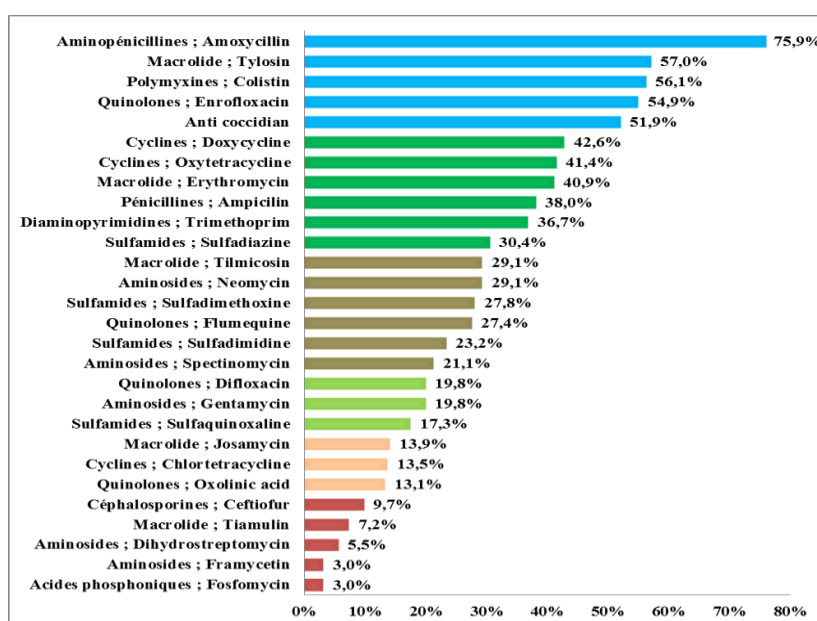


Figure 22: The opinion of veterinarians on the effect of antibiotics.

## 4. Discussion

### 4.1. Frequent pathologies

According to the observations collected by the National Network of Epidemiological Observations in Aviculture Avian Pathology in 2004, the frequencies of respiratory and digestive disorders were observed in broilers [8], which are among the most common diseases seen on farms, accounting for almost 70% of all cases seen in a diagnostic laboratory or on poultry farms [9].

While locomotor and nervous disorders are also dominant in avian pathology, these disorders concern 5 to 20% of animals, the integrity of nervous, muscular, joint and bone tissues must be ensured [10].

Nutrition-related diseases can be directly toxic products in food, and sometimes vitamin deficiency

leads to reduced growth and increased susceptibility to viral and bacterial infections. While complex metabolic diseases result from the conjunction of deficiencies and degraded breeding or feeding conditions [10].

According to Berghiche *et al.* [11], they encountered 94.6% of bacterial diseases, 91.2% of viral diseases, 78.4%, 42.3%, and 9.6% for parasitic, metabolic, and other diseases, respectively.

The monkeys of Clinical of Newcastle (ND) affecting the neurological, gastrointestinal, reproductive, and respiratory systems [12]

### 4.2. Digestive and respiratory pathologies

#### 4.2.1. Digestive

The digestive inflammation does cause tissue damage, the loss of functionality, reduce flock performance, increase morbidity [13, 14], while newly

hatched chicks lack digestive microflora and are highly susceptible to enteropathogen colonization and infection [15].

Several infectious microorganisms are capable of altering the digestive system, in particular; The protozoan belonging to the *Eimeria* genus, which causes Avian coccidiosis, they colonize and infect the intestinal tract [16-18]; *E. coli* (APEC) is a leading cause of morbidity and mortality which is known to Colibacillosis than refers specifically to a localized or systemic infection [19-21]; *Clostridium perfringens* causes necrotic enteritis (NE), imposing an economic burden on the poultry industry worldwide [22-24] *C. Perfringens* is also responsible for subclinical infections, associated with chronic damage of the intestinal mucosa [17, 25]; *H. meleagridis* cause the Lesions to trigger Histomoniasis, also known as “blackhead disease ” or “enterohepatitis”, is a parasitic disease. which are noticed as thickening of the caecal wall, bleeding in the mucosa and fibrinous masses in the lumen of the caecum [26-28]; the Newcastle disease virus (NDV) cause Newcastle disease (ND), is a serious contagious disease of domestic poultry [29, 30]. the *Salmonella* infection is one of the most important bacterial diseases in poultry causing mortality and reduced production [31, 32], colonize the intestinal tract of poultry can persist throughout the bird’s lifespan [33]. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) causes fowl typhoid in commercial poultry, a disease characterized by acute systemic infection [34, 35]; Infectious bursal disease (IBD), infectious bursitis or Gumboro disease, is an acute and highly contagious viral disease in young chickens. Infection with IBD, leads to severe immunosuppression, this disease manifests as acute and subclinical forms in chicks [36-38]; In poultry, *Pasteurella. multocida* causes fowl cholera, which is a serious disease with clinical signs that include depression, ruffled feathers, fever, anorexia, mucous discharge from the mouth, diarrhoea, increased respiratory rate, septicaemia and death [39, 40]; Several bacteria causing omphalitis were isolated in a study carried by Jalob *et al.* [41] and Khan *et al.* [42]. Among these bacteria : *streptococcus*, *E.coli*, *proteus*, *pseudomonas*, *staphylococcus*, *Pasteurella*, *klebsiella*, *Enterococcus*, *Enterobacter spp*, *Clostridium spp* and

*bacillus spp*. Such isolates may represent chicks which have been necropsied at the age of 4-5 days [41, 43, 44]

#### 4.2.2. Respiratory

According to Berghiche *et al.*[11] The classification of viral diseases registered has been the subject of veterinary alerts, sufficiently explains the level of infection affecting the poultry farms such as Newcastle, Gumboro, and infectious bronchitis with a rate of 44, 31, and 18%, respectively. The study also revealed that the occurrence of zoonotic Avian Influenza (5%) and the emerging Infectious Rhinotracheitis (2%) was low in the region. Primary lesions of the epithelium of the upper respiratory tract caused by an infectious agent (infectious bronchitis virus, Newcastle disease virus, mycoplasmas) [45]. Respiratory infections are the most serious diseases affecting poultry and cause heavy economic losses. While acute diseases cause heavy mortalities, the subclinical and chronic cases lead to the production losses [46], various regions of respiratory tract viz., trachea, lungs and air sacs differ in their susceptibility to respiratory irritants and pathogens [47]. Respiratory syndrome requires the association of several physiological factors acting in combination or synergy. Primary lesions are due either to a mycoplasma, or a wild or vaccine virus (paramyxovirus, orthomyxovirus, coronavirus, metapneumovirus, etc.), then associated or not with the mycoplasma itself. These lesions are most often aggravated by superinfection by one or more bacteria from digestive or ambient media: colibacilli, pasteurelles, *Ornithobacterium rhinotracheale*, staphylococci, *Avibacterium* (ex-*Haemophilus*) *paragallinarum*, *Bordetella*, streptococci [10, 48, 49]. In avian host, several microorganisms of the genus *Pasteurella*, *Bordetella* and *haemophilus* were involved in respiratory diseases complex [50]. *Escherichia coli* , *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Aspergillus fumigatus* associated with respiratory infection in chickens has also been reported [51-54]. Bacteria have also been reported from cases of yolk sac infection in chicks including, *Escherichia coli*, *proteus* , *mixed infection*, *streptococci*, *klebsiella*, *salmonella*, *staphylococci*, *pseudomonas* , *pasteurella* , *yarseinia* and *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*) [55-57]. In many cases, the bacterial component of a respiratory disease

---

colonizes the respiratory system only after a primary viral or environmental insult. Colonization of the airsacs of a chicken by *Escherichia coli* following an infectious bronchitis virus infection is an example of secondary bacterial invasion. In other cases, the bacterial component of the respiratory disease is the primary initiating cause of the disease. The coryza and fowl cholera infections in the chicken are examples of primary bacterial respiratory diseases in poultry [58, 59]. Several avian viruses have a predilection for the respiratory tract of chickens: infectious bronchitis virus (IBV), Newcastle disease virus (NDV), infectious laryngotracheitis virus (ILTV), avian influenza virus (AIV), pneumovirus primarily infect the respiratory tract of chickens [31, 55, 60-63]. have been recognized as the most important pathogens in poultry [46] because of the tendency to change its antigenic properties [60, 64].

#### 4.3. Microbial contamination depending on the age of the chicken

The recorded mortality rates are high (10 to 60%) and vary greatly according to age groups [65]. While start-up mortalities are likely linked to climatic conditions [66]. The proportion of farms infected with *Salmonella* is almost three times higher when the animals are older than 40 days, indicating an effect of age [67].

Prophylactic antibiotics administered for the age of the birds ranged from 4 to 32 weeks. In most cases, a prophylactic antibiotic is given usually weekly, and once every month or every three days [68], besides, the introduction of the antibiotic is due to the high risk of developing bacterial diseases early and throughout the breeding period.

#### 4.4. The state of stored food

The duration and conditions of food storage are factors to be taken into consideration, rancid lipids, by fat oxidation, are responsible for serious organic disorders [69], and also micromycetes or molds develop from a nutrient substrate such as food [10] therefore the breeder must ensure that moldy or degraded feed should not be distributed [70]. In many cases, contaminated feed is the major source of *Salmonella* infections in poultry [71].

#### 4.5. The quality of the litter in the storage area and on the poultry living area

The quality of rearing litter is defined in part by the physical characteristics of the excreta, due to their influence on the ease of handling excreta, on the risk of the appearance of lesions on the legs and keel, and on the spatial distribution (air, litter surface, litter depth) humidity in the breeding [72]. Litter contributes to the mood at start-up by acting as a thermal insulator and heat storage. It is composed of wood chips or chopped straw [73]. Litter is maintained by regularly adding small amounts of shavings or crushed straw and removing wet parts from leaking drinkers. Sufficient, well-maintained bedding is the first prevention against parasites (ascaris and coccidiosis) [73]. intestinal leakage caused by inflammation [74] causes liquid losses from broilers and diarrhea than increase litter moisture [75]. The litter isolates the chick from contact with the soil and absorbs moisture from the faeces which will then be removed by ventilation. Good litter is dry, healthy, not very fermentable, flexible, absorbent, insulating and thick [76].

#### 4.6. The ambient components of buildings

Respect for hygiene practices is fundamental in the success of modern breeding because it reduces ambient microbism, therefore the impact of diseases and the use of anti-infectives [77], most of them of breeders do not apply the correct breeding rules [78].

Non-infectious factors, such as climatic conditions (e.g. inadequate ventilation, high ammonia levels, too high or too low temperature) can also help in disease progress [59]. The farmer must ensure that the water supplied is potable and inspect the cleanliness of the drinkers daily [70].

Good feed efficiency is one of the main factors for improving chicken production [79]. The breeder must ensure that each animal, from birth to slaughter, consumes 3 feeds during its growth, according to current conventional standards: 0-23d start; growth 23 to 35 days; finishing 35 to 56j [80]. Inadequate food storage conditions by breeders, lack of air conditioning, and adequate air circulation could help mold growth [81].

The effectiveness of old built-up litter as a sanitary procedure, which allows the prevention or control of coccidiosis and mortality [82, 83].



Temperature and lighting are considered the most important factors, as it has a direct impact on animals, often causing heat stress and affects broiler behaviors, production performance, and well-being [84, 85].

Ventilation allows the poultry to breathe well. It allows the elimination of odors and toxic gases, (resulting from the fermentation of the litter) [73, 76]. It ensures the elimination of dust released by litter when it is too dry and allows the spread of pathogenic germs. It also ensures the evacuation of the water eliminated by the birds in the form of vapor and in the droppings, or that of the drinkers (drying of the litter) [10, 73]. Finally, it allows the elimination of calories, that is to say of the heat given off by animals or absorbed by the building [73].

Poultry farmers invest little in their production tool (renovation of buildings, installation of equipment necessary to improve the atmosphere and health status, etc.) because they find the cost of these investments high [86].

The characteristics of the livestock building strongly condition the state of health and the zootechnical performance of the animals [87].

The components of the atmosphere in barns have a positive or negative influence on the health of chickens. The control of these factors leads to a standardized breeding. An imbalance of one parameter contributes to a problem with the breeding process.

#### 4.7. Diagnostic means

The success of a clinical examination depends better on the knowledge and experience of the physician. In most cases, only one case is responsible for damage and malformations in the animal. Many doctors begin with a general examination that includes an extensive search for abnormalities. The information gained during the examination allows identifying the pathogen, type of lesion present and the organs involved [88, 89].

Careful postmortem examination supported by one or more antemortem laboratory tests can greatly assist in reaching a confirmatory diagnosis [90].

[Berghiche et al. \[11\]](#) confirms our results according to a study on an investigation on the predominant diseases, its diagnosis, and commonly used drugs in the poultry farms in the North-Eastern regions of Algeria, it was found that among the different diagnostic

techniques, the laboratory diagnostic method is the least used (02%). Also, in the eastern region of Algeria, veterinarians often use clinical diagnosis (86%).

#### 4.8. The intervention phase

The veterinary company only exists insofar as it responds to a demand from its customers [91], the latter determines the phase of the veterinarian's intervention.

The customer relationship in the veterinary environment must mainly be linked to relationships and the exchange of information [92] for a rapid and adequate intervention. In most cases, the veterinarian does not intervene very much, and the breeder sees no interest in turning to him to solve his problem [93]. While the veterinarian is not simply there to respond to a request, he can stimulate and guide it [93]. Health interventions are generally irregular and above all insufficient; which is one of the main causes of the high mortalities recorded within the farms [65].

Many breeders tend to rely on veterinarians when setting up animals. These provide health, prophylactic and therapeutic monitoring throughout the economic life of the herd [94].

#### 4.9. Control of hygienic conditions

The most basic rules of hygiene were often neglected; corpses strewn around the area around the farm which lacked cleanliness and allowed the proliferation of pests, especially rats; the use of second hand soiled and never cleaned cells was also common practice; the breeding equipment (drinkers, hoppers) was not or was poorly maintained [95], which the English team of Coates and Fuller showed that the growth of chickens is better in a new building or very clean than in an old uncleaned building [96]. It is noted that prevention is based on good hygiene and production practices and on a vaccination program [76].

#### 4.10. Determination of the method of counting chickens for treatment

There is usually a heterogeneity in the weight of broiler chickens within the flock compared to the ideal weight required.

The prescription can take place after consultation with the patient (s) but also after the establishment of a

---



diagnosis based on the collection of a certain amount of information, insofar as the breeding concerned is the subject regular health monitoring and care provided by the prescribing veterinarian [97]. The dose to be administered often depends on the weight of the animal [98].

One of the first risky behaviors with respect to antibiotics is not to assess the weight of the animals, and therefore not to give the sufficient dose, or on the contrary to overdose [99].

- Prescribing antibiotics:

Narrow spectrum antibiotics are effective against only a few types of bacteria (Gram positive or Gram negative bacteria), while Broad spectrum antibiotics treat a wide range of infections [100, 101].

- Managing the preparation of the drugs to be distributed:

The stability of some drug molecules can be significantly affected over time when they are in solution. Ex: amoxicillin is not very stable in solution [102], and must therefore be quickly distributed after dissolution.

- The person responsible for the administration of antibiotics:

In approximately 98% of the selected farms, non-veterinary persons administered antibiotics to poultry birds [103]. Few animal raising householders are trained on veterinary practices; however, they are themselves in charge of most veterinary activities such as vaccination, animal prophylactic and treatment [104]. While the administration of antibiotics by such individuals could lead to under-dosing or over-dosing of birds [105]. Veterinarians are the authorized professionals responsible for diagnosis, prescriptions and administration of antibiotics to farm animals in many developed countries [106]. Only 4.16 per cent respondents treated their birds by Veterinarian [107]

- The route and the means of antibiotic administration:

The oral route is the most widely used route of administration 98% relative to injection food [11].

This preponderance of the oral route of antibiotics is explained by the almost systematic use of collective treatments in the avian sector [110]. Injection is, for obvious reasons, used exceptionally for antibiotic therapy, drinking water being the usual route which comes down to its convenience and responsiveness to intervention [97].

On chicken farms, antimicrobials were administered using water (100% of cases) [111]. Antibiotics can also be administered in form of injectable, tablet, bolus, drench, and bath, wash or added to feed and drinking water [112].

#### 4.11. A first treatment failure

These high levels of antibiotic resistance can be explained by the misuse and unwise use of antibiotics in the prevention of avian diseases [113]. While a perfect knowledge of the infectious process and the pharmaco-dynamic and kinetic characters of the antibiotic as well as its fate in the organism, raising awareness among breeders about the management of their breeding pharmacy and the importance monitoring of the veterinarian's prescription are all means of combating the failure of anti-infectious therapy [99]. Where than a study conducted by Berghiche et al. [11] on Antibiotics Resistance in Broiler Chicken from the Farm to the Table in Eastern Algeria shows that 96% of failures, according to the surveyed veterinarians, are mainly due to the development of antimicrobial resistance [11].

#### 4.12. The therapeutic interventions

During antibiotic treatment, resistant bacteria will be favored over sensitive bacteria. The duration of exposure (number of days of treatment) is a favorable factor for this selection [114]. The veterinarians have become only drug distributors with a great lack of health monitoring [11].

#### 4.13. Frequency of therapeutic interventions

A higher frequency of resistance was seen in conventional farms, and this is due to conventional farms employ the regular use of antimicrobials [115].

The number of antibiotics used, depending on the case, in each production unit, semi-industrial and industrial is high from 1 to 6 times [104].

On chicken farms antimicrobials were administered for prevention of disease on 11 (73.3%) instances and for treatment on four occasions (26.7%) (due to respiratory disease) [111].

The frequency of administration should be adapted according to certain criteria such as age or species [116].

#### 4.14. Management of antibiotic therapy failures

According to [Berghiche et al. \[11\]](#) Among various diagnostic techniques, the laboratory diagnosis method is least used (02%).

Before initiating antibiotic treatment, certain procedures must be followed, including the degree of damage to the general condition of the animal to be treated, to ensure a good treatment regimen. And also that the dose must guarantee a sufficient concentration in the affected tissues. The duration of treatment should be based on changes in the general condition of the animal and should continue for up to two days after the initiation of clinical improvement [116]. But the too long a treatment duration also represents a non-negligible risk of selection of resistance. too low a rate with a time-dependent antibiotic leads to therapeutic voids at the origin of a primary underdosing, secondarily leading to the selection of antibiotic resistant bacteria [99].

The dosages are therefore strongly recommended, especially for molecules with a narrow therapeutic margin (aminoglycosides and glycopeptides), the dosage of which is simple and rapid. For the other molecules said to have a wider therapeutic margin (b lactams), the dosages are to be carried out according to the pathophysiological state of the patient (renal or hepatic insufficiency, assisted ventilation, etc.), the interactions expected with other molecules , in the event of a high MIC requiring high dosages, insufficient therapeutic results, *etc.* These dosages should be undertaken as quickly as possible, from the first doses in order to optimize the treatment as quickly as possible. [117].

The most producers use antibiotics to prevent infection diseases not according to the prophylactic or therapeutic dosage, length of treatment and withdrawal time indicated on the product label, but most of them use a higher dosage and don't respect the recommendations of the drug producer [104, 118].

#### 4.15. Stopping treatment of the antibiotic

Length of treatment and withdrawal time indicated on the product label, but most of them use a different dosage and don't respect the recommendations of the drug producer [104]

The choice of an anti-infective is conditioned by the etiology of the infectious process (sensitivity of germs), the location of the infection (bioavailability of the anti-microbial), the severity of the disease, the price of the intervention. The first-aid treatment can be modified after checking the causal germ and the sensitivity of an anti-infective against this germ [119].

The determination of the choice of an antimicrobial is based on the expected effectiveness of the treatment [120].

#### 4.16. Contact with the regional laboratory (antibiogram)

Bacterial isolation, and even more so the antibiogram, are not routine analyzes required in the context of veterinary activity. They are generally reserved for the most severe cases and/or after treatment failure [121]. However, the antibiogram being a technique for evaluating sensitivity *in vitro*, it only makes it possible to predict the efficacy or, on the contrary, the clinical failure of the treatment undertaken *in vivo* [99]. Will help guide treatment. It therefore represents an essential step [122].

The veterinarian's relationship with the client after the procedure

Promoting animal health and welfare is often synonymous with engaging clients in animal management practices [123]

The dynamic relationship between the veterinarian and the client is the typical way of communicating. The predominant approach is mostly parenting, where the veterinarian sets the consultation agenda, takes on the role of the guardian and assumes that the client's values match their own, resulting in veterinarians contributing most of the talking and clients playing a passive role [124]

However, some veterinarians have difficulty communicating and proactively consulting [125], and to make matters worse are the many complexities of managing herd health by farmers [126].

---

In a medical context, good adherence can be described as strict adherence to the treatment prescribed on the doctor's prescription. This involves no addition or removal of medication from those already prescribed and no changing of the dose, number of times or duration as indicated on the prescription. [127]

The veterinarian should be aware of the strengths and weaknesses of the owner. Especially if the recommendations and treatments he prescribes are very expensive and the latter does not have the financial means to carry them out. In some cases, he must take on the role of teacher in order to teach the owner what he wants it to be applied. [128]

#### 4.17. The rate of antibiotics use

Abuse of antibiotics is a common practice in the field of poultry farming in Algeria [118], and the use of antibiotics in veterinary medicine is the subject of much debate [129]. Between 40 to 80% of antibiotics are used for therapeutic purposes that can be questioned. Since 80% of veterinary antibiotics are used in prophylaxis or as a growth promoter [130]. Globally, an estimated 50% of all antimicrobials serve veterinary purposes [131].

#### 4.18. The effect of antibiotics

The current benefits of continued antibiotic use in commercial production indicate improved mortality, morbidity, growth, and feed efficiency [132]. It appears that the primary goal of using antimicrobial agents for the treatment of infections is to eradicate the pathogen as quickly as possible with minimal adverse effects on the recipient [133]. A good eradication of the pathogen requires that the antibiotic must bind to a specific "active site" on the microorganism, on the one hand and on the other hand the concentration of the antimicrobial is sufficient to occupy a critical number of these sites. specific active agents on the microorganism and this for an adequate period of time [132].

Fosfomycin is used primarily for the treatment of infectious diseases of broilers [134]. While the treatment is mainly based on antibiotic therapy. The most commonly used antibiotics are sulfonamides, betalactamines, and quinolones [135]. A decrease in

water consumption and the subsequent decrease in antibiotic absorption are generally interpreted as a lack of antibiotic efficacy [136].

Antibiotics prophylaxis administered to the birds were chloramphenicol (40/110), penicillin (20/110), doxycycline (20/110), gentamicin (10/110), neomycin (10/100) and a combination of chloramphenicol, ampicillin, penicillin and cloxacillin (10/100). These were administered either weekly (90/110), every 3 days (10/110) or monthly (10/100) [68].

## 5. Conclusion

The survey that we carried out is very important, as the information that we obtained through the participation of veterinarians, enabled us to understand the current situation faced by the breeders' farms of broiler chickens.

As it became clear to us that the real problem is that the farms operate without a license, and this is what makes them far from supervision by the competent authority.

Also, the chicken breeder does not care to involve the veterinarian in the first stages of his activity for several considerations, including reducing the cost of diagnosis, relying on the Chicken breeders, experienced in treating and diagnosing, which is often far from what is recommended by veterinarians.

In the absence of a prescription, antibiotics without prescribing to the breeder, as well as offering them in popular markets, it becomes easy to acquire these medicines, which the doctors does not recommend.

The veterinarian bears part of the responsibility when he does not submit a prescription, track farm cases, and keeps them in private documents, as the absence of archiving hinders tracking cases and understanding the situation over the years.

For the sake of proper flow and tracking of antibiotic consumption, we suggest count all informal farms and regularizing their legal status. As well as the introduction of digital information in order to inventory each private or public veterinarian of the practices he performs on farms.

Emphasis should be placed on continuing education for veterinarians and educating them and farmers on the need to limit the indiscriminate use of antibiotics.

## Acknowledgment

The authors thank all the members of the Educational Microbiology Laboratory, of Abdelhamid Ibn Badis University Mostaganem, Algeria) and all the veterinarians who helped us.

## Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

## References

- [1] Meguenni N., Chanteloup N., Tourtereau A., Ahmed C. A., Bounar-Kechih S. *et al.*, Virulence and antibiotic resistance profile of avian *Escherichia coli* strains isolated from colibacillosis lesions in central of Algeria, *Veterinary World*, 12 (11) (2019) :1840. DOI: [10.14202/vetworld.2019.1840-1848](https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1840-1848).
  - [2] Asfaw Y., Ameni G., Medhin G., Alemayehu G., Wieland B., Infectious and parasitic diseases of poultry in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis, *Poultry science*, 98 (12) (2019): 6452-6462. DOI: [10.3382/ps/pez521](https://doi.org/10.3382/ps/pez521).
  - [3] Chardon H., Brugere H.; Usages des antibiotiques en élevage et filières viandes, Centre d'Information des Viandes, (2014). Available online: [https://www.veterinaire.fr/fileadmin/user\\_upload/images/CRO/Languedoc-Roussillon/actualites/AB\\_Usage\\_antibiotiques\\_elevage\\_CIV\\_2014\\_H\\_Chardon-H\\_Brugere\\_-\\_copie.pdf](https://www.veterinaire.fr/fileadmin/user_upload/images/CRO/Languedoc-Roussillon/actualites/AB_Usage_antibiotiques_elevage_CIV_2014_H_Chardon-H_Brugere_-_copie.pdf). Accessed on 10/11/2020
  - [4] Fleury M., Impact de traitements antibiotiques sur la flore digestive du porcelet : Etude in vivo et développement d'une approche en système de fermentation in vitro. Médecine humaine et pathologie. Université Rennes 1, 2015. Français. (NNT : 2015REN1B002). (tel-01156521).
  - [5] Ducrot C., Adam C., Beaugrand F., Belloc C., Bluhm J., *et al.*, Apport de la sociologie à l'étude de la réduction d'usage des antibiotiques, *INRA Productions Animales*, Paris: INRA, 31 (4) (2019): 307-324. Available online: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02101571/document> Accessed on 15/12/2020
  - [6] Sanders P., Bousquet-Mélou A., Chauvin C., Toutain P.-L., Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique, *Institut National de la Recherche Agronomique Productions Animales*, 24 (2) (2011): 199-204. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2011.24.2.3254>
  - [7] Lhermie G., Sans P., Ferchiou A., Raboisson D., Perspective socio-économique des politiques publiques encourageant l'usage raisonné des antibiotiques en élevage, *Innovations Agronomiques*, 77 (2019): 85-90. [dx.doi.org/10.15454/19tm-q942](https://doi.org/10.15454/19tm-q942)
  - [8] Souillard R., Toux J., Le Bouquin S., Michel V., Le RNOEA: Réseau National d'Observations Epidémiologiques en Aviculture Pathologie aviaire en 2004, *Bulletin Epidémiologique-AFSSA*, 24 (2007): 6-7. Available online: <https://be.anses.fr/sites/default/files/BEP-mg-BE24-art3.pdf> Accessed on 15/12/2020
  - [9] Shivaprasad H. L., Differential Diagnoses for Diseases of Poultry Based on Organ Systems and other outlines, T. B. S. o. V. M. California Animal Health and Food Safety Laboratory System, University of California, Davis, Editor. 2014. p. 74.
  - [10] Guérin J.-L., Balloy D., Villate D., *Maladies des volailles*. 2012: Edition France Agricole. ISBN 10 : 285557210X / ISBN 13 : 9782855572109
  - [11] Berghiche A., Khenenou T., Labiad I., Antibiotics resistance in broiler chicken from the farm to the table in Eastern Algeria, *Journal of World's Poultry Research*, 8 (4) (2018): 95-99. Available online: <http://jwpr.science-line.com>
  - [12] Miller P. J., Afonso C. L., El Attrache J., Dorsey K.M., Courtney S.C. *et al.*, Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses, *Developmental & Comparative Immunology*, 41 (4) (2013): 505-513. DOI: [10.1016/j.dci.2013.06.007](https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.06.007).
  - [13] Jimenez J. A., Uwiera T. C., Inglis G. D., Uwiera R. R., Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals, *Gut pathogens*, 7 (1) (2015): 29. DOI: [10.1186/s13099-015-0076-y](https://doi.org/10.1186/s13099-015-0076-y).
  - [14] Lee K., Lee S., Lillehoj H., Li G., Jang S., *et al.*, Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry, and immune characteristics in broiler chickens, *Poultry Science*, 89 (2) (2010): 203-216. DOI: [10.3382/ps.2009-00418](https://doi.org/10.3382/ps.2009-00418).
  - [15] Nurmi E., Rantala M., New aspects of Salmonella infection in broiler production, *Nature*, 241 (5386) (1973): 210-211. DOI: [10.1038/241210a0](https://doi.org/10.1038/241210a0).
  - [16] Blake D. P., Tomley F. M., Securing poultry production from the ever-present Eimeria challenge, *Trends in parasitology*, 30 (1) (2014): 12-19. DOI: [10.1016/j.pt.2013.10.003](https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.10.003).
  - [17] Shojadoost B., Vince A. R., Prescott J. F., The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review, *Veterinary research*, 43 (1) (2012): 74. DOI: [10.1186/1297-9716-43-74](https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-74).
  - [18] Haug A., Gjevre A.-G., Thebo P., Mattsson J. G., Kaldhusdal M., Coccidial infections in commercial broilers: epidemiological aspects and comparison of Eimeria species identification by morphometric and polymerase chain reaction techniques, *Avian pathology*, 37 (2) (2008): 161-170. DOI: [10.1080/03079450801915130](https://doi.org/10.1080/03079450801915130).
  - [19] Chansiripornchai N., Comparative efficacy of enrofloxacin and oxytetracycline by different administration methods in broilers after experimental infection with avian pathogenic *Escherichia coli*, *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 39 (3) (2009): 231-236. <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/tjvm/article/view/35850>
  - [20] Guabiraba R., Schouler C., Avian colibacillosis: still many black holes, *FEMS microbiology letters*, 362 (15) (2015): fnv118. DOI: [10.1093/femsle/fnv118](https://doi.org/10.1093/femsle/fnv118).
  - [21] Robineau B., P.-Y., Moalic. Une maladie d'actualité en production aviaire: la colibacillose, 2010. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*. 163 (3) (2010): 207-212. <https://doi.org/10.4267/2042/48050>
  - [22] Wade B., Keyburn A., The true cost of necrotic enteritis, *PoultryWorld*, 31 (7) (2015): 16-17. [Text version]. <https://www.poultryworld.net/Meat/Articles/2015/10/The-true-cost-of-necrotic-enteritis-2699819W/>
-



- [23] Cooper K. K., Songer J. G., Uzal F. A., Diagnosing clostridial enteric disease in poultry, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25 (3) (2013): 314-327. DOI: [10.1177/1040638713483468](https://doi.org/10.1177/1040638713483468).
- [24] Gaucher M.-L., "Étude de l'impact de deux traitements, dont un sans antibiotiques, sur la santé digestive et les populations de *Clostridium perfringens* dans des élevages de poulets de chair", Ph.D Thesis, Veterinary sciences, Montreal university, Canada, 2016. p333. Available online: <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/13372>
- [25] Skinner J. T., Bauer S., Young V., Pauling G., Wilson J., An economic analysis of the impact of subclinical (mild) necrotic enteritis in broiler chickens, *Avian diseases*, 54 (4) (2010): 1237-1240. DOI: [10.1637/9399-052110-Reg.1](https://doi.org/10.1637/9399-052110-Reg.1).
- [26] Liebhart D., Ganas P., Sulejmanovic T., Hess M., Histomonosis in poultry: previous and current strategies for prevention and therapy, *Avian Pathology*, 46 (1) (2017): 1-18. DOI: [10.1080/03079457.2016.1229458](https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1229458).
- [27] Tyzzer E. E., Studies on Histomoniasis, or "Blackhead" Infection, in the Chicken and the Turkey. in *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, 69 (5) (1934): 191-212. JSTOR. <https://doi.org/10.2307/20023041>
- [28] Patra G., Prasad H., Lalsiamthara J., Kataria J., Malsawmkima D. et al., Prevalence of *Histomonas meleagridis* in broiler chicken in different parts of Mizoram, India, *Int. J. Poult. Sci*, 12 (2013): 98-101. <https://dx.doi.org/10.3923/ijps.2013.98.101>
- [29] Alexander D. J., Aldous E. W., Fuller C. M., The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research, *Avian pathology*, 41 (4) (2012): 329-335. DOI: [10.1080/03079457.2012.697991](https://doi.org/10.1080/03079457.2012.697991).
- [30] Aldous E., Alexander D., Newcastle disease in pheasants (*Phasianus colchicus*): a review, *The Veterinary Journal*, 175 (2) (2008): 181-185. DOI: [10.1016/j.tvjl.2006.12.012](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.12.012).
- [31] Haider M., Hossain M., Hossain M., Chowdhury E., Das P. et al., Isolation and characterization of enterobacteria associated with health and disease in Sonali chickens, *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 2 (1) (2004): 15-21. <https://doi.org/10.3329/bjvm.v2i1.1928>
- [32] Yang J., Gao S., Chang Y., Su M., Xie Y. et al., Occurrence and Characterization of *Salmonella* Isolated from Large-Scale Breeder Farms in Shandong Province, China, *BioMed Research International*, 2019 (2019): 8159567. DOI: [10.1155/2019/8159567](https://doi.org/10.1155/2019/8159567).
- [33] WHO, Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. Vol. 1; 2002: World Health Organization.
- [34] Penha Filho R. A. C., Ferreira J. C., Kanashiro A. M. I., Darini A. L. d. C., Berchieri A. Junior, Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum isolated from ill poultry in Brazil, *Ciência Rural*, 46 (3) (2016): 513-518. <https://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150398>
- [35] Barrow P., *Salmonella* control-Past, Present and Future, *Avian Pathology*, 22 (4) (1993): 651-669. <https://doi.org/10.1080/03079459308418954>
- [36] Sellaoui S., Alloui N., Mehenaoui S., Djaaba S., Evaluation of size and lesion scores of bursa cloacae in broiler flocks in Algeria, *J. World's Poult. Res*, 2 (2012): 37-39. Available online: <http://jwpr.science-line.com/attachments/article/13/JWPR.%20B8.%2037-39.%202012..pdf>. Accessed on 28/07/2020
- [37] Mahgoub H. A., An overview of infectious bursal disease, *Archives of virology*, 157 (11) (2012): 2047-2057. DOI: [10.1007/s00705-012-1377-9](https://doi.org/10.1007/s00705-012-1377-9).
- [38] Müller H., Islam M. R., Raue R., Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future, *Veterinary microbiology*, 97 (1-2) (2003): 153-165. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.08.005>
- [39] Rhoades K., Rimler R., *Pasteurella multocida* colonization and invasion in experimentally exposed turkey poults, *Avian diseases*, 34 (2) (1990): 381-383. <https://doi.org/10.2307/1591423>
- [40] Boyce J. D., Harper M., Wilkie I., Adler B., (2010). *Pasteurella*. In *Pathogenesis of bacterial infections in animals*; John Wiley & Sons. p. 325-346. <https://doi.org/10.1002/9780470958209.ch17>
- [41] Jalob Z. K., Farhan W. H., Ibrahim Z. Y., Bacteriological and Pathological Study of Omphalitis in Broiler Chicks, *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences*, 6 (2) (2015): 17-26. Available online: <https://www.iasj.net/iasj/article/126818>. Accessed on 01/11/2020
- [42] Khan K. A., Khan S. A., Aslam A., Rabbani M., Tipu M. Y., Factors contributing to yolk retention in poultry: a review, 2004. Available online: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00179202/document>
- [43] Cortés C. R., Isaías G. T., Cuello C. L., Flores J. M. V., Anderson R. C. et al. Bacterial isolation rate from fertile eggs, hatching eggs, and neonatal broilers with yolk sac infection, *Revista latinoamericana de microbiología*, 46 (1-2) (2004): 12-16. Available online: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenL.cgi?IDARTICULO=1158>
- [44] Ulmer Franco A. M., "Yolk sac infections in broiler chicks: studies on *Escherichia coli*, chick acquired immunity, and barn microbiology". 2011. Ph.D thesis, Animal science, Alberta University, Canada. <https://doi.org/10.7939/R3WH37>
- [45] Ler Catherine S., Rosine D. D. D., *Escherichia coli*, une bacterie ubiquiste et versatile. Neuviemes Journees de la Recherche Avicole, Tours, France, 29 et 30 mars 201. [Ninth Aviculture Research Days, Tours, France, March 29 and 30, 2011]. [Text version]
- [46] Roussan D., Haddad R., Khawaldeh G., Molecular survey of avian respiratory pathogens in commercial broiler chicken flocks with respiratory diseases in Jordan, *Poultry science*, 87 (3) (2008): 444-448. DOI: [10.3382/ps.2007-00415](https://doi.org/10.3382/ps.2007-00415).
- [47] Nighot P., Kolte G., Ghalsasi G., Physiopathology of avian respiratory diseases-Respiratory diseases are often complex and multi-factorial but understanding the important factors can help in disease control, *Poultry International*, 41 (9) (2002): 24-29.
- [48] Nassik S., Rahmatallah R., Fassi Fehri O., EL houadfi M., Séroprévalence de *Mycoplasma gallisepticum* et de *Mycoplasma synoviae* dans les élevages reproducteurs type poulet de chair au Maroc de 1983 au 2005, *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 1 (3) (2013): 32-34. Available online: [https://www.agrimaroc.org/index.php/Actes\\_IHAVH2/article/view/307](https://www.agrimaroc.org/index.php/Actes_IHAVH2/article/view/307)
- [49] Maho A., Mbeurnodji L., Ndobale B., Dominantes pathologiques aviaires à N'Djaména: étude de quinze fermes, *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 50 (4) (1997): 277-280.

- <https://doi.org/10.19182/remvt.9556>
- [50] Hafez H. M., Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*, Int. J. Poult. Sci, 1 (5) (2002): 114-118. <https://dx.doi.org/10.3923/ijps.2002.114.118>
- [51] El-Sukhon S. N., Musa A., Al-Attar M., Studies on the bacterial etiology of airsacculitis of broilers in northern and middle Jordan with special reference to *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Bordetella avium*, Avian diseases, 46 (3) (2002): 605-612. DOI: [10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0605:SOTBEO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0605:SOTBEO]2.0.CO;2).
- [52] Vandamme P., Segers P., Vancanneyt M., Van Hove K., Muters R. *et al.*, *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 44 (1) (1994): 24-37. DOI: [10.1099/00207713-44-1-24](https://doi.org/10.1099/00207713-44-1-24).
- [53] Ahad A., Rabbani M., Mahmood A., Kuthu Z. H., Muhammad A. A. *et al.*, Zoonosis Update on H9N2 Avian Influenza Virus, Pakistan Veterinary Journal, 33 (3) (2013): 272-276. Available online: [http://www.pvj.com.pk/archive/Volume\\_33\\_Issue\\_3\\_2013.htm](http://www.pvj.com.pk/archive/Volume_33_Issue_3_2013.htm)
- [54] Van Veen L., Van Empel P., Fabri T., *Ornithobacterium rhinotracheale*, a primary pathogen in broilers, Avian Diseases, 44 (4) (2000): 896-900. <https://doi.org/10.2307/1593063>
- [55] Beeckman D. S. A., Vanrompay D. C., Biology and intracellular pathogenesis of high or low virulent *Chlamydia psittaci* strains in chicken macrophages, Veterinary microbiology, 141 (3-4) (2010): 342-353. DOI: [10.1016/j.vetmic.2009.09.032](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.032).
- [56] Iqbal M., Shah I., Ali A., Khan M., Jan S., Prevalence and in vitro antibiogram of bacteria associated with omphalitis in chicks, Pakistan Veterinary Journal, 26 (2) (2006): 94-96. Available online: [http://pvj.com.pk/pdf-files/26\\_2/94-96.pdf](http://pvj.com.pk/pdf-files/26_2/94-96.pdf). Accessed on 25/11/2020
- [57] Melese K., Esatu W., Abayneh T., Isolation and characterization of bacteria associated with yolk sac infection (Omphalitis) in chicken from three hatcheries in Bishoftu, Ethiopia, African Journal of Microbiology Research, 11 (43) (2017): 1551-1557. <https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8363>
- [58] Glisson J. R., Bacterial respiratory disease of poultry, Poultry science, 77 (8) (1998): 1139-1142. DOI: [10.1093/ps/77.8.1139](https://doi.org/10.1093/ps/77.8.1139).
- [59] Umar S., " Avian influenza and co-infections: investigation of the interactions in the poultry models ", Doctorat de dissimulation, 2017, Toulous universitym France. Available online: [https://oatao.univ-toulouse.fr/19547/1/Umar\\_Sajid.pdf](https://oatao.univ-toulouse.fr/19547/1/Umar_Sajid.pdf). Accessed on 11/12/2020
- [60] Villegas P., Viral diseases of the respiratory system, Poultry science, 77 (8) (1998): 1143-1145. DOI: [10.1093/ps/77.8.1143](https://doi.org/10.1093/ps/77.8.1143).
- [61] Oldoni I., García M., Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates from the US by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions, Avian Pathology, 36 (2) (2007): 167-176. DOI: [10.1080/03079450701216654](https://doi.org/10.1080/03079450701216654).
- [62] H. Bourougâa H., Miled K., Larbi I., Nsiri J., Gribâa L. *et al.*, La bronchite infectieuse aviaire en tunisie: seroprevalence, pathogenicite et etude de compatibilite vaccin-isolats, Archives de l'Institut Pasteur de Tunis, 86 (1-4) (2009): 75-83. [Text version]
- [63] Ducatez M. F., Martin A. M., Owoade A. A., Olatoye I. O., Alkali B. R. *et al.*, Characterization of a new genotype and serotype of infectious bronchitis virus in Western Africa, Journal of General Virology, 90 (11) (2009): 2679-2685. DOI: [10.1099/vir.0.012476-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.012476-0).
- [64] Shankar B., Common respiratory diseases of poultry, Veterinary World, 1 (7) (2008): 217-219. Available online: <http://www.veterinaryworld.org/2008/No.7.html>
- [65] Ouedraogo S., Zoundi S., Approvisionnement de la ville de Ouagadougou en poulets de chair. p67. In Agriculture urbaine en Afrique de l'Ouest: une contribution à la sécurité alimentaire et à l'assainissement des villes = Urban agriculture in West Africa: contributing to food security and urban sanitation. 1999. Ed. CRDI, Ottawa, Ontario, Canada/ACP-UE, Wageningen, Netherlands, e-ISBN 1552502619. [HTML version]. <https://www.idrc.ca/sites/default/files/openebooks/261-9/index.html>
- [66] Diaw M. T., Dieng A., Mergeai G., Sy M., Hornick J.-L., Effets de la substitution du tourteau d'arachide par la fève de coton conventionnel en production de poulet de chair au Sénégal, Tropicicultura, 28 (3) (2010): 139-147. Available online: <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/80637/1/28-3-139.pdf>
- [67] Chaïba A., Filali F. R., Prévalence de la contamination par *Salmonella* des élevages de poulet de chair au Maroc, Cahiers Agricultures, 25 (3) (2016): 35007. <https://doi.org/10.1051/cagri/2016017>
- [68] Arhin R. E., Hackman H. K., Sa-eed A., Antibiotic prophylaxis and cloacal carriage of resistant zoonotic bacteria in commercially-bred poultry, European Journal of Animal Health, 1 (1) (2019): 1-13. <https://doi.org/10.47672/ejah.424>
- [69] Bac N., Biagianti S., Bruslé J., Etude cytoologique ultrastructurale des anomalies hepatiques du loup, de la daurade, et de l'anguille, induites par une alimentation artificielle. In Bases biologiques de l'aquaculture, Montpellier, 12-16 decembre 1983. Ifremer Proceedings, (1983): 473-484. Available online: <https://archimer.ifremer.fr/recordview>
- [70] Dutertre C., Le label rouge en production porcine: état des lieux et perspectives, Techni-porc, 24 (3) (2001): 13-18. Available online: <https://www.ifip.asso.fr/sites/default/files/pdf-documentations/tp2001n3dutertre.pdf>. Accessed on 12/11/2020
- [71] Al-Natour M. Q., Alshawabkeh K. M., Using varying levels of formic acid to limit growth of *Salmonella gallinarum* in contaminated broiler feed, Asian-australasian journal of animal sciences, 18 (3) (2005): 390-395. <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.390>
- [72] Carré B., De Monredon F., Melcion J.-P., Gomez J., Qualité de la litière en aviculture. Aliments et caractéristiques physiques des excréta, INRA Productions animales, 8 (5) (1995): 331-334. Available online: <https://doi.org/10.20870/productions-animales.1995.8.5.4146>
- [73] Dayon J. F., Arbelot B., Guide d'élevage des volailles au Sénégal, Dakar: DIREL, 1997. Available online: . Accessed on 26/08/2020
- [74] Awad W. A., Hess C., Hess M. M., Enteric pathogens and their toxin-induced disruption of the intestinal barrier through alteration of tight junctions in chickens, Toxins, 9 (2) (2017): 60. <https://dx.doi.org/10.3390/toxins9020060>
- [75] Song J., Xiao K., Ke Y., Jiao L., Hu C. *et al.*, Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress, Poultry science, 93 (3) (2014): 581-588. DOI: [10.3382/ps.2013-03455](https://doi.org/10.3382/ps.2013-03455).



- [76] Jacquet M., (2007). Guide pour l'installation en production avicole. 2<sup>ème</sup> partie. La production de poulets de qualité différenciée: mise en place et résultats. Gembloux (Belgique):[en-ligne] accès internet: FACW, Accès internet: [www.facw.be/dossierstechniques/guide-1-installation-2-me-partie.pdf](http://www.facw.be/dossierstechniques/guide-1-installation-2-me-partie.pdf). Accessed on 14/10/2020
- [77] Cardinale E., Dieng C., Pene G., Wade I., Diallo A., Tall F., Kane P., Konte M., Les pratiques hygiéniques des aviculteurs sénégalais, Impact sur la productivité, 4<sup>ème</sup> Journées de la Recherche Avicole, Nantes, France, (2001): 333-336.
- [78] Abba H., Somda M. K., Antipas B.-b. B., Barro N., Traore A. S., Prévalence et susceptibilité aux antibiotiques des souches de Salmonella spp. non typhiques isolées de la viande de poulets au Tchad, International Journal of Biological and Chemical Sciences, 11 (1) (2017): 107-117. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v11i1.9>
- [79] Barea R., Fantinati P., Piva A., Effects of a microencapsulated feed additive on growth performance and sanitary status of broiler chickens [Conference poster], Actes des 11<sup>ème</sup> Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, Tours, France, les 25 et 26 mars 2015, (2015): 600-605.
- [80] Baratou J., Vachel. J.-P. , X--Valeur alimentaire chez le poulet dans les conditions pratiques de l'élevage. In Annales de zootechnie. 1971. Available online: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00887145> Accessed on 2/12/20
- [81] Saleh K., Sarhan M. A., Clastogenic analysis of chicken farms using micronucleus test in peripheral blood, Journal of Applied Sciences Research, 3 (12) (2007): 1646-1649. Available online: <http://www.aensiweb.com/old/jasr/jasr/2007/1646-1649.pdf>. Accessed on 23/08/2020
- [82] Chinivasagam H., Tran T., Blackall P., Impact of the Australian litter re-use practice on Salmonella in the broiler farming environment, Food Research International, 45 (2) (2012): 891-896. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.014>
- [83] Kennard D., Chamberlin V., Growth and mortality of chickens as affected by the floor litter, Poultry Science, 30 (1) (1951): 47-54. <https://doi.org/10.3382/ps.0300047>
- [84] Parvin R., Mushtaq M., Kim M., Choi H., Light emitting diode (LED) as a source of monochromatic light: a novel lighting approach for behaviour, physiology and welfare of poultry, World's Poultry Science Journal, 70 (3) (2014): 543-556. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1017/S0043933914000592>
- [85] Thornton P. K., Van de Steeg J., Notenbaert A., Herrero M., The impacts of climate change on livestock and livestock systems in developing countries: A review of what we know and what we need to know, Agricultural systems, 101 (3) (2009): 113-127. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2009.05.002>
- [86] Mahmoudi N., Yakhlef H., Thewis A., Caractérisation technico-socio-professionnelle des exploitations avicoles en zone steppe (wilaya de M'sila, Algérie), Cahiers Agricultures, 24 (3) (2015): 161-169. <https://doi.org/10.1684/agr.2015.0752>
- [87] Le Menec M., Les bâtiments d'élevage de volailles, L'aviculture française. Informations techniques des Services Vétérinaires du Ministère de l'Agriculture, Paris, France, (1988): 81-119.
- [88] Frandson R., Wilke W., Fails A., Anatomy and physiology of the mammary glands, Anatomy and Physiology of Farm Animals, 7<sup>th</sup> Wiley-Blackwell, Iowa, USA, 20 ISBN : 978-0-8138-1394-3 09.
- [89] Ballard B., Rockett J., Restraint & Handling for Veterinary Technicians & Assistants, Cengage Learning 2009. ISBN 1435453581, 9781435453586
- [90] Bello A., Umaru M., Baraya Y., Adamu Y., Jibir M. et al., Postmortem procedure and diagnostic avian pathology, Scientific Journal of Zoology, 229 (1305) (2012): 1-5. Available online: <https://sjournals.com/index.php/sjz/article/view/1186>
- [91] Koleilat N., L'intérêt du marketing des services en clientèle vétérinaire: Etude des attentes clients et fiches techniques. 2010.
- [92] Henry J., La communication dans la relation client: analyse des pratiques des vétérinaires équin à partir d'une enquête. 2014. Available online: <https://oatao.univ-toulouse.fr/10924/>
- [93] Farout B., Référentiel pour la définition de plans de traitement des infections mammaires en troupeau laitier, Bull. Acad. Vét. de France, 155 (2002): 135-138. available online: <http://documents.irevues.inist.fr/handle/2042/61515>
- [94] Lhermie G., Raboisson D., Krebs S., Dupraz P., Facteurs déterminants et leviers de réduction de l'usage des antibiotiques en productions animales, Économie rurale, (4) (2015): 3-22. <https://doi.org/10.4000/economierurale.4671>
- [95] Cardinale E., Arbelot B., Kaboret Y., Dayon J.-F., Biau C. et al., La maladie de Gumboro dans les élevages semi-industriels de la région de Dakar, Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux, 51 (4) (1998): 293-296. Available online: <https://agritrop.cirad.fr/475731/>
- [96] Corpet D. E., Mechanism of antimicrobial growth promoters used in animal feed, Revue de Médecine Vétérinaire, 151 (2) (2000): 99-104. Available online: <https://www.revmedvet.com/artdes-us.php?id=918>
- [97] Rossigneux R., Balloy D., Traçabilité du médicament vétérinaire-registre d'élevage: particularités de la filière volailles, Bull. Acad. Vét. France; 156 (4) (2003): 13-16. Available online: <http://documents.irevues.inist.fr/handle/2042/47666>
- [98] Guillemot D., Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. 2006; Rapport. p. 214. Available online: <https://www.vie-publique.fr/sites/default/files/rapport/pdf/074000079.pdf>. Accessed on 02/07/2020
- [99] Chatellet M.-C., "Modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin: enquête en Anjou". Thèse de doctorat, Faculté de médecine de Créteil, Créteil, France, 2007. Available online : <http://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id=138>
- [100] Adzitey F., Antibiotic classes and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from selected poultry; a mini review, World Vet. J., 5 (3) (2015): 36-41. [dx.doi.org/10.5455/wvj.20150853](https://doi.org/10.5455/wvj.20150853)
- [101] Faure S., "Transfert d'un gène de résistance aux beta-lactamines blaCTX-M-9 entre Salmonella et les entérobactéries de la flore intestinale humaine: influence d'un traitement antibiotique". Ph.D Thesis [French], Rennes University, France, 2009. p191. Available online: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00449376>
- [102] Mogenet L., Bezille P., Guyonnet J., Karembe H., Comparaison de la flumequine (flumisol) à l'amoxicilline (vetrimoxin poudre orale) dans deux modes d'administration par voie orale, en traitement de la colibacillose du poulet: approche pharmacodynamique et clinique, Revue de médecine vétérinaire, 148 (10) (1997): 793-804. Available online: <https://www.revmedvet.com/artdes-fr.php?id=208>

- [103] Boamah V. E., Agyare C., Odoi H., Dalsgaard A., Practices and factors influencing the use of antibiotics in selected poultry farms in Ghana, *Journal of Antimicrobial Agents*, 2 (2) (2016): 2-8. <https://doi.org/10.4172/2472-1212.1000120>
- [104] Kim D. P., Saegerman C., Douny C., Dinh T. V., Xuan B. H. *et al.*, First survey on the use of antibiotics in pig and poultry production in the Red River Delta region of Vietnam, *Food Public Health*, 3 (5) (2013): 247-256. [HTML version]. <http://article.sapub.org/10.5923.j.fph.20130305.03.html>
- [105] Maron D. F., Smith T. J., Nachman K. E., Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey, *Globalization and health*, 9 (1) (2013): 48. <https://doi.org/10.1186/1744-8603-9-48>
- [106] Mainda G., Bessell P. R., Muma J. B., McAteer S. P., Chase-Topping M. E. *et al.*, Prevalence and patterns of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolated from Zambian dairy cattle across different production systems, *Scientific reports*, 5 (2015): 12439. p11. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fsrep12439>
- [107] Kisku J., Oraon J., Pandey A., Singh B. K., Chandraker K., Study of Adoption Level and Constraints Faced by Rural Women in Backyard Poultry Farming, *Journal of AgriSearch*, 6 (Special) (2019): 101-103. Available online: <https://jsure.org.in/journal/index.php/jas/article/view/607/473>
- [108] Guillemot D., Maugeudre P., Chauvin C., Sermet C., Consommation des antibiotiques en France, Numéro thématique : Résistance aux antibiotiques «Résistance à la résistance», *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire (InVs)*, 32-33 (2004): 144-147. Available online: <https://www.santepubliquefrance.fr>
- [109] Méheust D., Chevance A., Moulin G., Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2015. Rapport annuel. Anses, 2016. p108. Available online: <https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2016.pdf>
- [110] Chevance A., Moulin G., Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2008. Volumes et estimation de la consommation d'antibiotiques chez les animaux. Edition scientifique, Rappor AFSA-ANVM, 2009. p81. Available online: <https://hal-anses.archives-ouvertes.fr/anses-01081630/document>
- [111] Nguyen N.T., Nguyen H.M., Nguyen C.V., Nguyen T.V., Nguyen M.T. *et al.*, Use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern Vietnam and its association with resistance in commensal *Escherichia coli* bacteria, *Applied and environmental microbiology*, 82 (13) (2016): 3727-3735. <https://doi.org/10.1128/AEM.00337-16>
- [112] Clement M., Olabisi M., David E., Issa M., Veterinary pharmaceuticals and antimicrobial resistance in developing countries. in *Veterinary Medicine and Pharmaceuticals*; 2019, IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84888>
- [113] Wegener H. C., Antibiotics in animal feed and their role in resistance development, *Current opinion in microbiology*, 6 (5) (2003): 439-445. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.009>
- [114] Sanders P., Bousquet-Mélou A., Chauvin C., Toutain P.-L., Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique, *INRA Productions Animales*, 24 (2) (2011): 199-204. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2011.24.2.3254>
- [115] Siemon C. E., Bahnson P. B., Gebreyes W. A., Comparative investigation of prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* between pasture and conventionally reared poultry, *Avian Diseases*, 51 (1) (2007): 112-117. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2007\)051\[0112:ciopaa\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2007)051[0112:ciopaa]2.0.co;2)
- [116] Espinasse J., Antibiothérapie et antibioprévention chez les bovins, *Rec.Méd.Vét.*, 159 (6) (1983): 549-559.
- [117] Garraffo R., Lavrut T., Signification clinique des corrélations pharmacocinétique/pharmacodynamie des antibiotiques chez les patients de réanimation, *Réanimation*, 14 (4) (2005): 264-275. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2005.04.006>
- [118] Goossens H., European strategies to control antibiotic resistance and use, *Annals of Clinical Microbiology*, 2014; 17 (1) (2014): 1-8. <http://dx.doi.org/10.5145/ACM.2014.17.1.1>
- [119] Navetat H., Rizet C., (2000). Diarrhées néonatales, quand faut-il recourir à l'antibiothérapie ? In *Proceeding of the 'Journées Nationales GTV/INRA: antibiothérapie et antibiorésistance'*, Nantes, France, 26-28/05/1999. pp. 107-112.
- [120] Anthony F., Acar J., Franklin A., Gupta R., Nicholls T. *et al.*, Antimicrobial resistance: responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine, *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 20 (3) (2001): 829-837. <https://doi.org/10.20506/rst.20.3.1318>
- [121] Gay E., Chazel M., Danielle M., Haenni M., Calavas D. *et al.*, Apport du Résapatha la problématique de l'antibiorésistance en santé animale: analyse des données recueillies en 2008 sur *Escherichia coli* dans les différentes filières animales, *Bulletin Épidémiologique AFSSA*, 36 (2010): 6-9. Available online: <https://hal-anses.archives-ouvertes.fr/hal-00486913>. Accessed on 15/11/2020
- [122] Wagner N., Ceroni D., Niederer A., Ritz N., Relly C., Prise en charge des infections ostéo-articulaires aiguës de l'enfant, *PAEDIATRICA*, 28 (1) (2017): 7-11. Available online: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:107702>
- [123] Bard A. M., Main D. C., Haase A. M., Whay H. R., Roe E. J. *et al.*, The future of veterinary communication: Partnership or persuasion? A qualitative investigation of veterinary communication in the pursuit of client behaviour change, *PLoS One*, 12 (3) (2017): e0171380. DOI: 10.1371/journal.pone.0171380.
- [124] Shaw J. R., Bonnett B. N., Adams C. L., Roter D. L., Veterinarian-client-patient communication patterns used during clinical appointments in companion animal practice, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228 (5) (2006): 714-721.
- [125] Jansen J., Steuten C., Renes R., Aarts N., Lam. T., Debunking the myth of the hard-to-reach farmer: effective communication on udder health, *Journal of Dairy Science*, 93 (3) (2010): 1296-1306. DOI: 10.3168/jds.2009-2794.
- [126] LeBlanc S., Lissemore K., Kelton D., Duffield T., Leslie K., Major advances in disease prevention in dairy cattle, *Journal of dairy science*, 89 (4) (2006): 1267-1279. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72195-6.
- [127] Valleteau de Moulliac J., Jouini O., Albonico V., Chevallier B., Observance médicamenteuse chez l'enfant: enquête par questionnaire auprès de 100 familles venues consulter aux urgences hospitalières, *Medecine & enfance*, 22 (8) (2002): 465-468. [HTML version]. [https://www.lesjta.com/article\\_ar\\_id\\_456.html](https://www.lesjta.com/article_ar_id_456.html). Accessed on 11/12/2020
-

- 
- [128] Friendship R., Noncompliance: A problem for swine practitioners, *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA)*, 1989.
- [129] DuPont H. L., Steele J. H., Use of antimicrobial agents in animal feeds: implications for human health, *Reviews of infectious diseases*, 9 (3) (1987): 447-460.  
<https://doi.org/10.1093/clinids/9.3.447>
- [130] Wise R., Hart T., Cars O., Streulens M., Helmuth R. *et al.*, Antimicrobial resistance. Is a major threat to public health, *BMJ: British Medical Journal*, 317 (7159) (1998): 609.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.317.7159.609>
- [131] Teuber M., Veterinary use and antibiotic resistance, *Current Opinion in Microbiology*, 4 (5) (2001): 493-499.  
[doi: 10.1016/s1369-5274\(00\)00241-1](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00241-1)
- [132] Phillips I., Casewell M., Cox T., De Groot B., Friis C. *et al.*, Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53 (1) (2004): 28-52.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkg483>
- [133] Capitano B., Nightingale C., Optimizing antimicrobial therapy through use of pharmacokinetic/pharmacodynamic principles, *Mediguide to Infectious Diseases*, 21 (2001): 1-8.
- [134] Falagas M. E., Vouloumanou E. K., Samonis G., Vardakas K. Z., Fosfomycin, *Clinical microbiology reviews*, 29 (2) (2016): 321-347. DOI: 10.1128/CMR.00068-15.
- [135] Stordeur P., Mainil J., La colibacillose aviaire, *Annales de Médecine Vétérinaire*, 146 (2002): 11-18. Available online: <http://www.facmv.ulg.ac.be/amv/resume.php?type=fr&id=34>
- [136] Saif Y. M., Fadly A. M., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K. *et al.*, *Diseases of Poultry.*; 2008. p. 43, Iowa State University Press. ISBN10: 0813807182 / ISBN13: 9780813807188

Submitted on: 20/03/2021

Revised form accepted on: 19/06/2021

Corresponding author: [bassem.jaouadi@cbs.mrt.tn](mailto:bassem.jaouadi@cbs.mrt.tn)



**Revue  
Nature et Technologie**

<http://www.univ-chlef.dz/revuenatec>

ISSN: 1112-9778 – EISSN: 2437-0312

# Cloning, expression, and structural modeling of two alkaline serine protease genes from extremophilic *Bacillaceae*-related species: Application in valorization of invasive crustaceans

Sondes MECHRI<sup>a</sup>, Khelifa BOUACEM<sup>b, c</sup>, Fawzi ALLALA<sup>b</sup>, Marwa KHALED<sup>b</sup>, Amel BOUANANE-DARENFED<sup>b</sup>, Hocine HACENE<sup>b</sup>, Bassem JAOUADI<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Microbial Biotechnology and Engineering Enzymes (LMBEE), Centre of Biotechnology of Sfax (CBS), University of Sfax, Road of Sidi Mansour Km 6, P.O. Box 1177, Sfax 3018, Tunisia

<sup>b</sup> Laboratory of Cellular and Molecular Biology (LCMB), Microbiology Team, Faculty of Biological Sciences (FSB), University of Sciences and Technology Houari Boumediene (USTHB), P.O. Box 32, El Alia, Bab Ezzouar, 16111 Algiers, Algeria

<sup>c</sup> Department of Biochemistry & Microbiology, Faculty of Biological and Agricultural Sciences, University Mouloud Mammeri of Tizi-Ouzou (UMMTO), P.O. Box 17, Tizi-Ouzou 15000, Algeria

## Abstract

Two novel protease genes *sapA* and *sapN* from the thermophilic *Anoxybacillus kamchatkensis* M1V and *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A<sup>T</sup> strains respectively, encoding a polypeptide of 381 and 379 residues, were identified, cloned and successfully heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. The deduced putative amino-acid residues of SAPA and SAPN enzymes evinced identity with proteases from *Bacillus* strains. The highest sequence identity value (95%) of SAPA was obtained with peptidase S8 from *Bacillus subtilis* WT 168, but with 16 amino-acids of difference. While, the highest sequence identity (97.10%) of SAPN was observed with *Bacillus licheniformis* MP1 protease, but with 10 difference residues. rSAPA and rSAPN enzymes were purified until homogeneity, characterized, and compared to wild-type proteases. The purified recombinant enzymes rSAPA and rSAPN were two monomers of about 28 and 30 kDa, correspondingly. rSAPA displayed the highest activity at pH 11 and 70°C. While, rSAPN displayed the highest activity at pH 10 and 75°C. To initiate structure-function relationships, a 3D-model of the Pro-SAPA and Pro-SAPN proteins were thereafter built based on the available structures of common proteases. The comparative molecular modeling studies with the less thermostable protease, revealed extra charged residues at the surface of SAPA and SAPN potentially participating in the formation of intermolecular hydrogen bonds with solvent molecules or generating salt bridges, therefore contributing to the higher thermal stability.

Keywords: Recombinant proteases; *Anoxybacillus kamchatkensis*; *Melghiribacillus thermohalophilus*; Comparative modeling.

## 1. Introduction

Nature has evolved microbial enzymes for millions of years towards the catalysis of fastidious reactions in a diversity of environments. Seeing as the introduction of biochemistry, microbial proteases have been the most extensively studied enzymes [1, 2]. In fact, they have gained significant attention due to their key role in metabolic activities and substantial use in industries [3], with an annual rate running somewhere about several

hundred tons. The leading factor prompting attention to serine alkaline proteases (SAPs) is the trade utility of this category of extremozymes [4-6]. Both the scientific community and industrial specialists embraced the innovative protein engineering attempts, since having a subtilisin fulfilling all industrial requirements is therefore like looking for a needle in a haystack. Noticeably, SAPs are key biocatalysts enzymes, used in many sectors likewise laundry detergents, peptides synthesis, food production, leather processing, and



This is an open-access document under the terms of the [Creative Commons Attribution License CC-BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which allows it to be shared, copied, reproduced, distributed, communicated, reused or adapted with the obligation to credit its author.

waste bio-conversion [4,6,7]. The preparation of a high value protein hydrolyste from marine by-products is one of main target of proteolytic enzymes engineering and technology.

These fields are focused on optimization and production approaches, purification until homogeneity, and characterization in order to select the appropriate proteases [4, 7]. For particular interest, the microorganisms called extremophiles, which are colonized the environments characterized by extreme levels of temperature, pressure, pH, and salinity secreted an extraordinary biomolecules that are functional and stable at cruel conditions which result in the precipitation or denaturation of the other ones [4].

Since extremophiles can provide these new biomolecules meeting many industrial needs, many researchers and industries are more and more focusing on these microorganisms [8]. That does not prevent the necessity of enzyme engineering and gene expressions are to improve native proprieties and potentially introduce innovative functionalities of proteolytic enzymes [9, 10]. Thereby, much attention has been paid towards the development and the characterization of efficient expression vectors. Recombinant DNA strategies are tools extensively applied for the protein expression in cells from Prokaryotic or Eukaryotic origin for fundamental and practical seeking purposes to obtain tailor-made subtilisins with desired functions and yield. Consequently, it is crucial to investigate the purification and secretion procedure to improve the expression effectiveness for the homologous/heterologous enzymes expression by optimizing vectors and host strains. Prokaryote and Eukaryote host strains are procurable for protein expression system. Bacteria (*Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*), yeasts (*Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*), and filamentous fungi (*Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*) are considered as the most employed, by benefiting from the capacity of each organism for the amelioration of the expressed protein. In addition, structural studies are critically important for understanding the molecular mechanisms of these proteases. The folding and structure predictions can be used to deduce catalytic active sites and potential binding partners and interfaces. Besides, in silico screening can be performed on close enzyme homologues with known structures.

Owing to the ease of expression and purification and 3D-structures availability, bacterial proteases befit the pattern of a bioengineering system.

As a branch of an ongoing project aiming at the study of novel attractive hydrolases from extremophilic *Bacillaceae*-related species, we have previously isolated two protease producing bacteria, identified as *Anoxybacillus kamchatkensis* strain M1V and *Melghiribacillus thermohalophilus* gen. nov., sp. nov., Nari2A<sup>T</sup>. The Algerian M1V and Nari2A<sup>T</sup> strains were isolated respectively from Hammam Righa<sup>1</sup> hot spring and from the soil of Chott Melghir<sup>2</sup>Salt Lake. This article focuses, on the cloning, and structural modeling of *sapA* and *sapN* genes encoding two extracellular proteases SAPA and SAPN expressed in *E. coli*, correspondingly from M1V and Nari2A<sup>T</sup> strains. The 3D-structural model of these enzymes was built following the cloning and expression of the *sapA* and *sapN* genes, and used to understand the interactive features of these proteases in these structural forms. The ability of rSAPA and rSAPN to deproteinize shrimp and blue crab by-products was also investigated.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

All substrates and chemicals were reagent grade unless specified otherwise. General reagents were obtained from commercial suppliers. The Hammerstein casein (Merck, Darmstadt, Germany)<sup>3</sup> was used as a substrate for proteolytic activity assay. DNA kits and materials were Invitrogen brand. The T100™ Thermal Cycler and DC protein analysis kit, for Bradford-based assay, were purchased from Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA)<sup>4</sup>. The DNA polymerase (*Pyrococcus furiosus*, pfu) was from Biotools (Madrid, Spain)<sup>5</sup>. The ABI DNA Genetic Analyzer Automated Sequencer 3100 was supplied by ABI (PRISM®, USA)<sup>6</sup>. The pH-STAT 907 Titrand was from Metrohm AG (Herisau, Switzerland)<sup>7</sup>. Ampicillin sodium salt USP

<sup>1</sup> Located in Ain Defla district in northwestern of Algeria

<sup>2</sup> Located in Biskra district in north-east of Algeria

<sup>3</sup><https://www.sigmaaldrich.com/>

<sup>4</sup><https://www.bio-rad.com/>

<sup>5</sup><https://www.bionity.com/>

<sup>6</sup><https://www.thermofisher.com/dz/en/home.html>

<sup>7</sup><https://www.metrohm.com/en/>



was purchased from Bio Basic (Markham, Canada Inc.)<sup>8</sup>. Isopropyl-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) and lysozyme were bought from Sigma-Aldrich Co, (St Louis, MO, USA). The culture media used were Luria-Bertani (LB) composed of yeast extract, 5 g; NaCl, 5 g; and peptone, 10 g per liter. The LB media was complemented with 18 g.L<sup>-1</sup> agar to make solid media.

## 2.2. Strains and vectors

Two *Escherichia coli* strains: DH5 $\alpha$ , Shot<sup>®</sup>TOP10, and BL21(DE3)pLysS came from Thermo Fisher Scientific, Inc., (Waltham, MA, USA) were used for cloning and expression of enzymes. Two wild-type extracellular protease SAPA and SAPN isolated respectively from Nari2A<sup>T</sup> and M1V strains were used as the reference proteases [9, 10]. The pCR-Blunt<sup>™</sup> was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The pUT57 derivative from pUC19 and pTrc99A were from CAYLA (Toulouse, France) and Addgene (LGC Standards, Teddington, UK), respectively. The wild-type extracellular proteases SAPA and SAPN isolated from M1V and Nari2A<sup>T</sup> strains, correspondingly were used as the reference enzymes [9, 10].

## 2.3. Amplification of *sapA* and *sapN* genes

General molecular biology protocols were determined as described by Sambrook *et al.* [11]. The amplification of the *sapA* and *sapN* genes encoding the SAPA and SAPN enzymes was performed using the genomic DNA of the strains *Anoxybacillus kamchatkensis* M1V and *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A<sup>T</sup>, respectively as a template. DNA amplification was performed with the Techne-Prime G Gradient Thermal Cycler, 96 $\times$ 0.2 mL. The amplification reaction mixtures (100  $\mu$ L) contained 30 pg of each primer, 300 ng of DNA template, amplification buffer, and 2U of DNA polymerase. The cycling parameters used were 94 $^{\circ}$ C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 $^{\circ}$ C for 30 s, primer annealing at 60 $^{\circ}$ C for 45 s, and extension at 72 $^{\circ}$ C for 90 s. The PCR products were then purified using an agarose gel extraction kit (Jena Bioscience, GmbH, Germany)<sup>9</sup>.

The amplification of the complete *sapA* gene and its flanking regions was performed using two primers: F-MS205'-CTGAGAAAGAAAAGGTTA-3' and R-MS215'-GTTGCTGCTGTTTACGCA-3', carrying flanking restriction site EcoRI. The purified ~1.3 kb PCR fragment was purified and cloned in pCR-Blunt<sup>™</sup> into *E. coli* DH5 $\alpha$  host strain, loading to a plasmid called pSM20 (Figure 1A).

The amplification of the complete *sapN* gene and its neighboring regions was performed using two primers: F-MS155'-CTGAGAAAGAAAAGGTTA-3' and R-MS16 5'-TCAAGATTTTTAAATAC-3', carrying flanking restriction site EcoRI. The purified ~1.4 kb PCR fragment was purified and cloned in pCR-Blunt<sup>™</sup> into *E. coli* TOP10 host strain, loading to a plasmid called pSM30 (Figure 1B).

The upstream F-MS15 and F-MS20 primers and downstream R-MS16 and R-MS21 primers were elaborated on the basis of the high sequence similarity found in *Bacillus* and homologous genes. Recombinant clones were grown in LB agar medium supplemented with 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> kanamycin sulfate, 160  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> X-Gal, and 360  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> IPTG. The colonies were screened by restriction digestion and by performing PCR amplification

The plasmids harboring DNA-inserts of predictable lengths were isolated using the DNA GeneJET Plasmid Miniprep Kit. The recombinant plasmids, termed pSM20 and pSM30, containing the open-reading-frame (ORF) encoding the pre-pro-enzyme SAPA and pre-pro-enzyme SAPN, correspondingly was used for extensive sequencing.

---

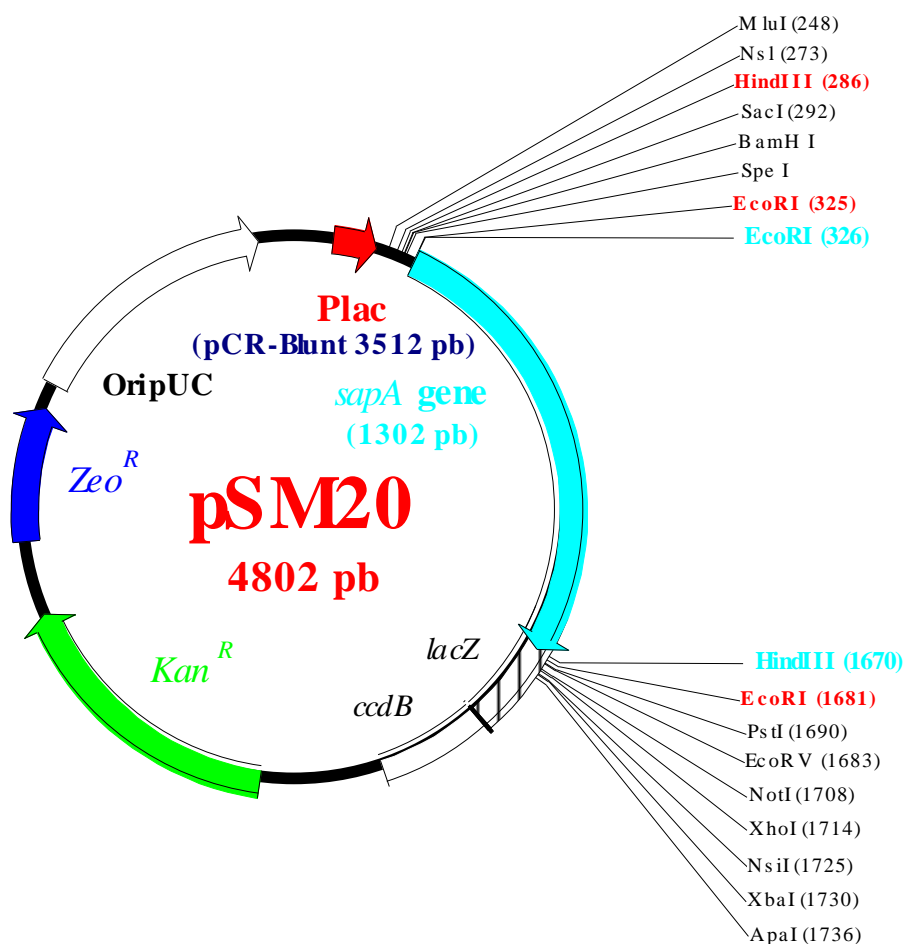
<sup>8</sup><https://www.biobasic.com/>

<sup>9</sup><https://www.jenabioscience.com/>

---







(A)

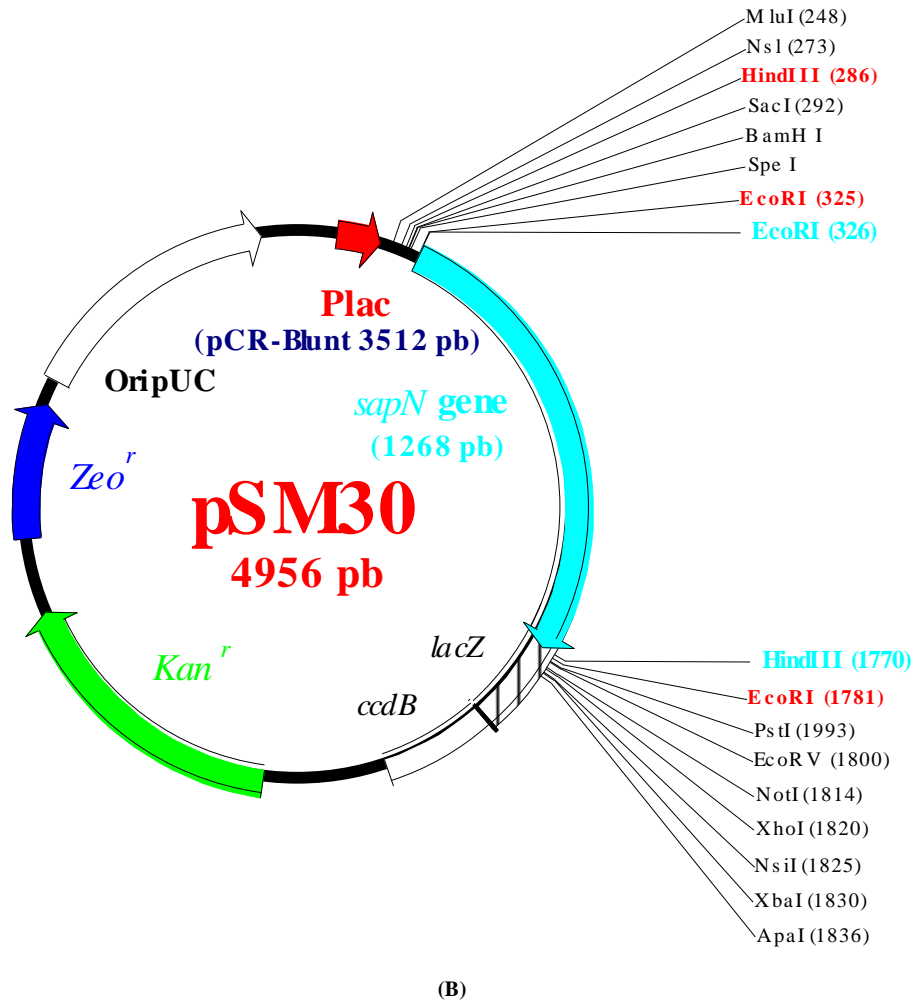


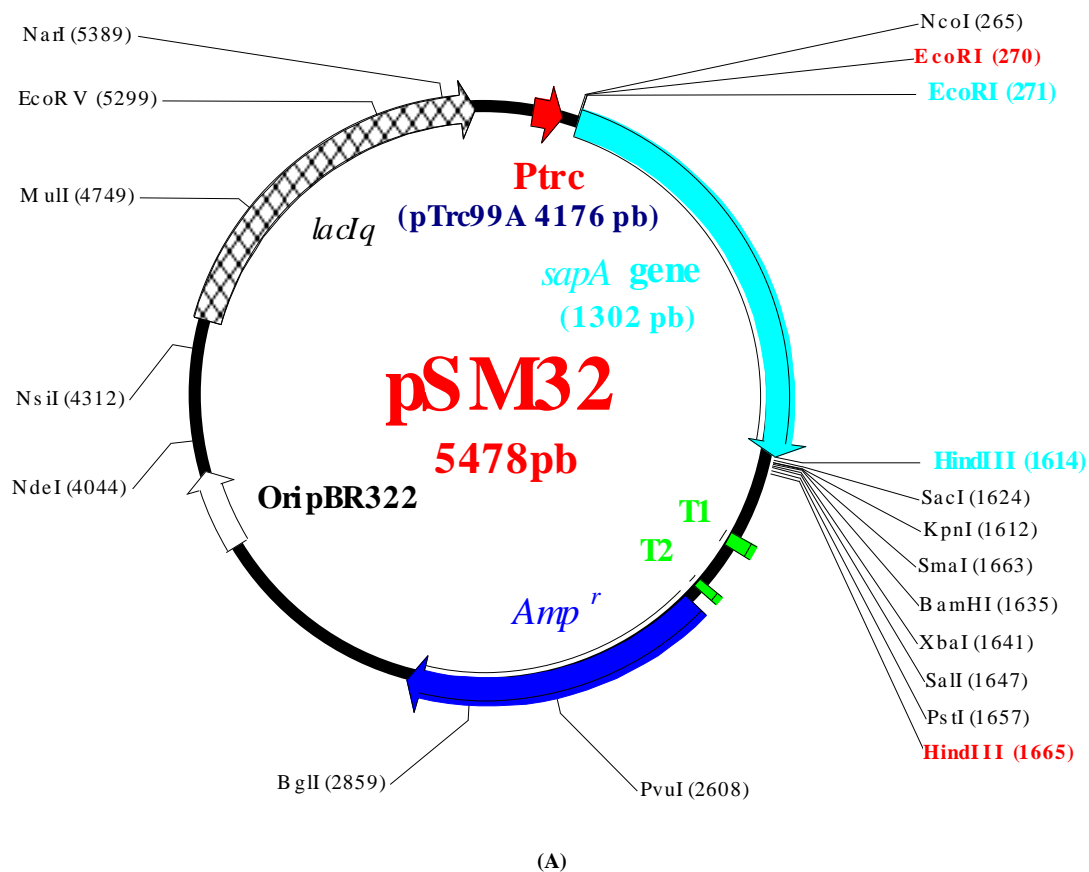
Figure 1: Maps of pSM20 (A) and pSM30 (B) plasmids

#### 2.4. Cloning and expression of *sapA* and *sapN* genes

The pSM20 plasmid was digested with *EcoRI* restriction enzyme and used for expression studies. The resulting DNA fragment, harboring the *sapA* encoding gene, was sub-cloned in the pUT57 vector into an *E. coli* BL21(DE3)pLysS previously digested with *EcoRI* enzyme giving the pSM21 plasmid (Figure 2.A).

Based on this construction, the *sapA* gene was generated as an *EcoRI* fragment and sub-cloned in the

pTrc99A vector linearized with the same restriction enzyme leading to pSM21 plasmid, noticed to harbor the *sapA* encoding gene, was sub-cloned in the pTrc99A vector into an *E. coli* BL21(DE3)pLysS under the control of the inducible *Ptac* promoter that was previously digested with the *EcoRI* restriction enzyme leading to the pSM22 plasmid (Figure 2.B).



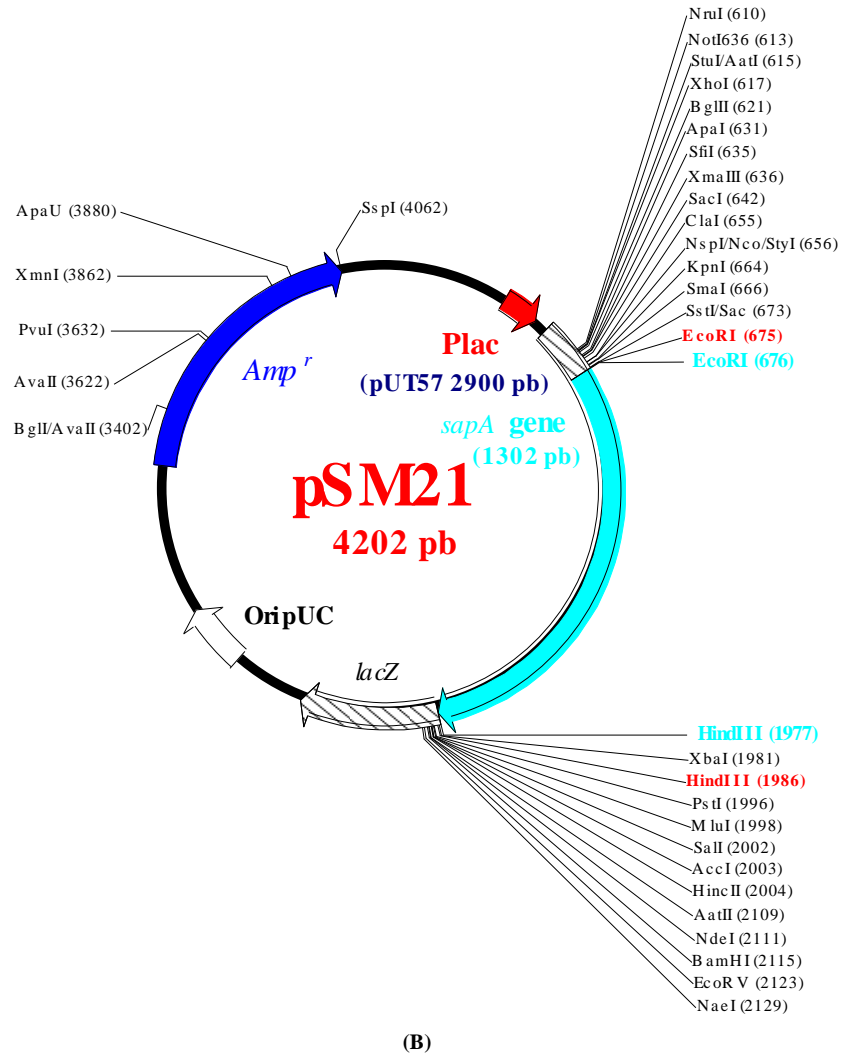
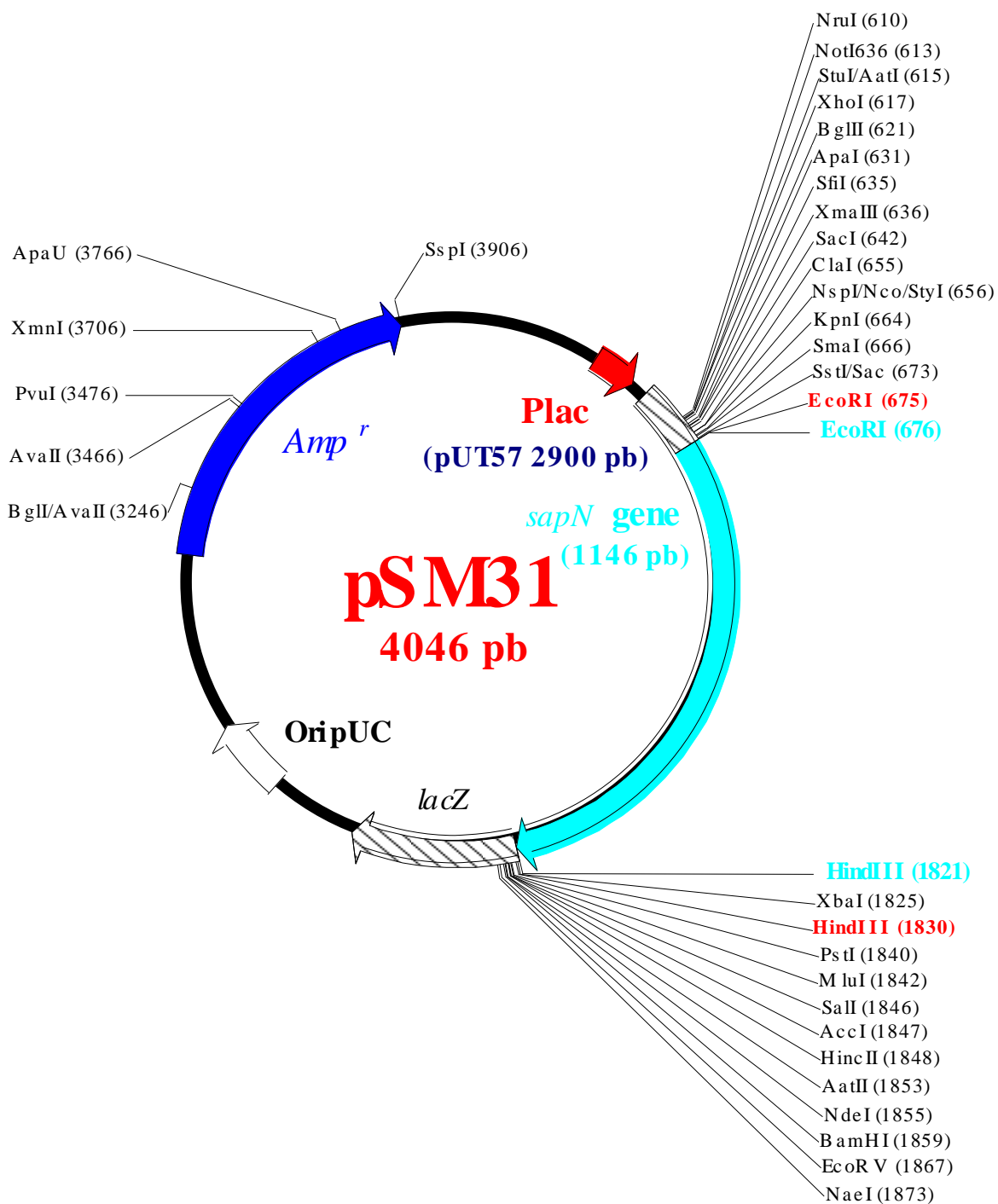


Figure 2: Maps of pSM21 (A) and pSM22 (B) plasmids.

The ORF region encoding SAPN was amplified with F-MS19 5'-GCGAATTCATGATGAGGAAAA GAGTTTTTG-3' and R-MS20 5'-CGAAGAAGCTTAT TGAGCGGCAGCTTC-3' primers by using pSM30. The PCR fragment containing the *sapN* gene was then double restricted with EcoRI and HindIII. The 99A inserted into the pSM31 (Figure 3.A) and pSM32 (Figure 3.B) plasmids, respectively, containing the pre-pro-enzyme SAPN (Figure 1). The pSM31 and pSM32 ligations served to transform *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS.

The transformants were selected on LB agar with 100 µg.mL<sup>-1</sup> ampicillin, 160 µg.mL<sup>-1</sup> X-Gal, and 360 µg.mL<sup>-1</sup> IPTG by the means of the blue white screening method. The constructions were verified by sequencing.



(A)



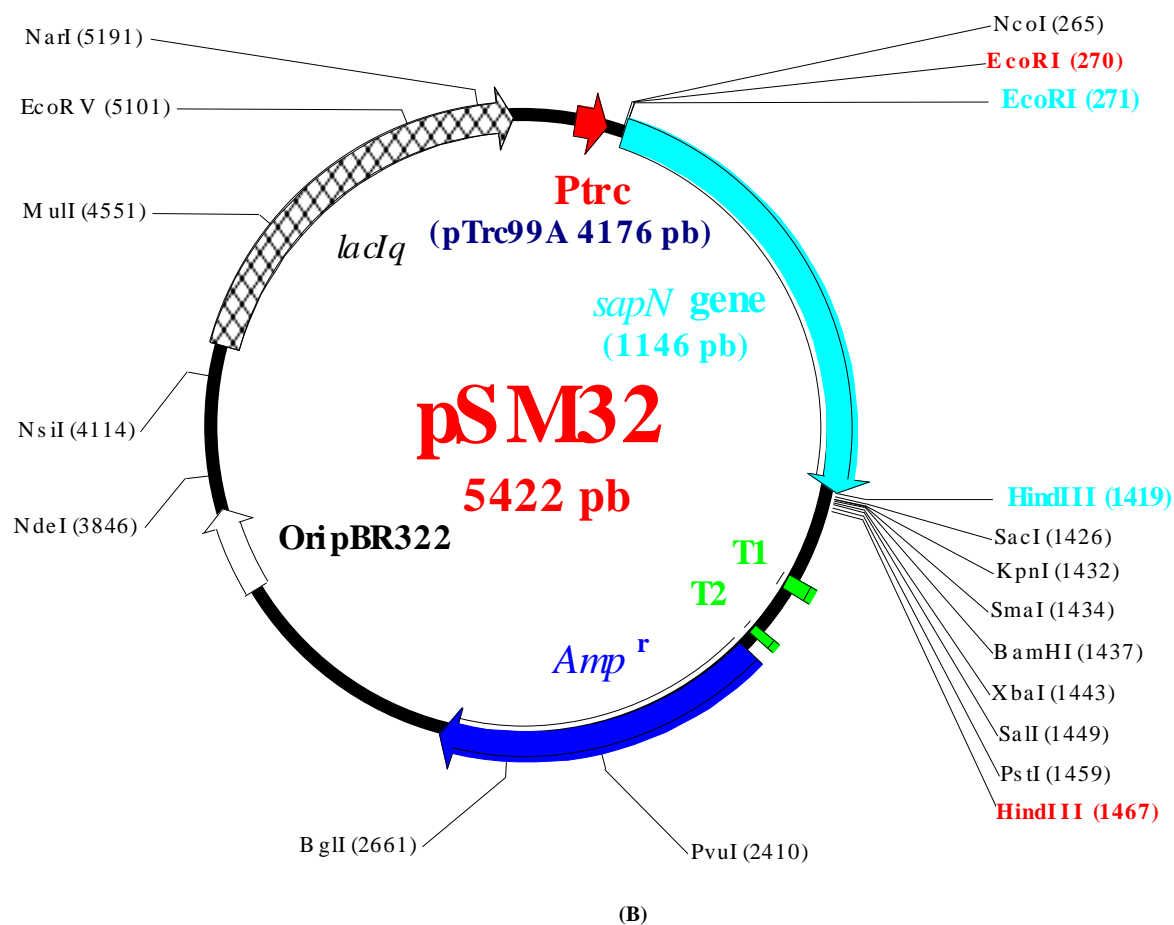


Figure 3: Maps of pSM31 (A) and pSM32 (B) plasmids.

## 2.5. Production and purification of the rSAPA and rSAPN

The transformants were grown in LB broth containing ampicillin and IPTG. After reaching an absorbance ( $A_{600\text{ nm}}$ ) of 0.8 units, the expression of each recombinant was induced by the addition of IPTG (0.5 and 0.4 mM for SAPA and SAPN, respectively). Next, the *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pSM22 and *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pSM32 were cultivated during 14 h (200 rpm and 37°C) and centrifuged. The culture supernatant was used for rSAPA and rSAPN purification, using the same protocol as for the native enzymes [9, 10].

After a centrifugation for 30 min at 10,000  $\times g$  of a 500 mL of each culture of *E. coli* BL21(DE3) pLysS/pSM22 and *E. coli* BL21(DE3) pLysS/pSM32, the both recombinant enzymes were purified to

homogeneity by ammonium sulfate fractionation, heat treatment, followed by sequential column chromatographies. For the rSAPA enzyme, the proteins were subjected to a precipitation with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at 35% and then centrifuged for 20 min at 10,000  $\times g$ . The obtained supernatant was saturated up to 70% with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , re-centrifuged, re-suspended in a minimal volume of 25 mM PIPES buffer at pH 6 supplemented with 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , and dialyzed overnight against the repeated changes of the same buffer. Hence, the obtained sample was re-centrifuged and loaded onto a UNO Q-6 column (12 mm  $\times$  53 mm) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) using FPLC system. The column was washed extensively with buffer B. The elution of proteins was executed by buffer B, containing a linear of NaCl gradient 0 to 500 mM at a rate of 30 mL/h. The collected of fractions was carried manually, and estimated by measuring absorbance at

280 nm. Fractions containing rSAPA enzyme activity, were concentrated and applied to HPLC system using a ZORBAX PSM 300 HPSEC (6.2 mm × 250 mm), Agilent Laboratories, pre-equilibrated with 25 mM HEPES buffer at pH 8 supplemented with 2 mM CaCl<sub>2</sub>. Fractions of each peak were collected at a flow rate of 30 mL/h and analyzed for caseinolytic activity and protein concentration. While, for rSAPN enzyme, the supernatant was precipitated to 35% with solid (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and then re-centrifuged. Next, the clear supernatant was saturated to 60% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and centrifuged; the pellet was dissolved in a minimal volume of 50 mM Tris-HCl buffer at pH 8 supplemented with 2 mM CaCl<sub>2</sub>. The clear supernatant was heated for 30 min at 80°C. The insoluble denatured proteins were removed by centrifugation. The supernatant was loaded on a Sephacryl S-200 HR column (2.5 cm × 150 cm) pre-equilibrated with 500 mM Tris-HCl buffer (pH 8). The pooled active fractions were then injected onto a UNO Q-6 column pre-equilibrated with 20 mM MOPS buffer at pH 7 supplemented with 2 mM CaCl<sub>2</sub>. The column was washed extensively with the same buffer. The proteins were eluted with 20 mM MOPS buffer (pH 7) containing a linear gradient of NaCl from 0 to 500 mM at a rate of 30 mL.h<sup>-1</sup>. The pooled fractions containing rSAPA and rSAPN activity were concentrated in centrifugal micro-concentrators (Amicon Inc., Beverly, MA, USA) with 10 kDa cut-off membranes and were stored at -20°C in a 20% glycerol (v/v) solution and then used for the determination of the biochemical properties.

## 2.6. Assay of proteolytic activity

Protease activity was investigated through the accumulation of free tyrosine resulting from casein degradation using the Folin-Ciocalteu reagent [12]. The rSAPA activity, was assessed at 70°C and bicarbonate-NaOH buffer (100 mM + 2 mM CaCl<sub>2</sub>) at pH 11. While for rSAPN protease reaction, the activity was assayed at 75°C and glycine-NaOH buffer (100 mM + 2 mM CaCl<sub>2</sub>) at pH 10. Then, 2.5 mL of TCA (200 g.L<sup>-1</sup>) were added to arrest the reaction. 30 min later, the cooled mixture was spin down (15,000 rpm, 20 min). The supernatant (0.5 mL) was merged with 500 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.5 mL) and Folin-Ciocalteu's phenol (0.5 mL), accompanied by incubation during 30 min at

23±2°C. One unit of SAPN activity corresponds to protease quantity necessary to generate one µg of tyrosine/min.

## 2.7. Protein determination and analytical methods

The protein contents were ascertained according to Bradford's method using the DC protein assay kit with bovine serum albumin as a standard [13]. The rSAPA and rSAPN molecular masses in denatured forms was resolved by the means of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under reducing conditions, using 12% separating gel (pH 8.8) and 5% stacking gel (pH 6.8) as described previously by Laemmli [14]. The protein bands were visualized with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)<sup>10</sup> staining. Substrate-PAGE (Zymography staining) was estimated by incorporating azocasein (1 mg.mL<sup>-1</sup>) into the separating gel before polymerization as detailed [15]. To remove SDS, the gels were rinsed twice, after the electrophoresis, for 30 min in 2.5% Triton X-100. The rSAPA and rSAPN protease activities were elucidated by the occurrence of clearance zone around the protein band on the blue background. Bands of purified recombinant enzymes were separated on SDS gels, transferred to a ProBlott membrane, and then the NH<sub>2</sub>-terminal sequence analysis was performed by automated Edman degradation using an Applied Bio system Model 473A gas-phase sequencer. The sequence was compared with those in the Swiss-Prot / TrEMBL data base with homology search<sup>11</sup>.

## 2.8. Biochemical characterization of the purified rSAPA and rSAPN

### 2.8.1. Behaviour against pH

The activity of the purified recombinant enzymes was measured at a pH range of 3 to 13 at 70°C for rSAPA enzyme and at 75°C for rSAPN enzyme and at using casein as substrate. Its pH stability was determined by pre-incubation of each recombinant enzyme in buffer solutions with different pH values for 24 h at 40°C. Aliquots were withdrawn, and residual enzymatic activity was determined at pH 11 and 70°C

<sup>10</sup> <http://www.bio-rad.com/>

<sup>11</sup> [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

for rSAPA and at pH 10 and 75°C for rSAPN. The following buffer systems, supplemented with 2 mM CaCl<sub>2</sub>, were used at 100 mM: glycine-HCl (pH 3-5), MES (pH 5-6), PIPES (pH 6-7), HEPES (pH 7-8), Tris-HCl (pH 8-9), glycine-NaOH (pH 9-11), bicarbonate-NaOH (pH 11-11.5), sodium phosphate dibasic-NaOH (pH 11.5-12), and potassium chloride-NaOH (pH 12-13).

### 2.8.2. rSAPA and rSAPN thermoactivity and thermostability assessment

The effect of temperature on each recombinant enzyme was examined at 30°C to 90°C for 15 min at pH 11 for rSAPA and at pH10 for rSAPN using casein as substrate. Their thermostability was determined by incubation for 24 h at 50°C to 80°C in the appropriate buffer for each enzyme in the presence or in the absence of 2 mM CaCl<sub>2</sub>. Aliquots were withdrawn at specific time intervals to test the residual activity under standard conditions. The non-heated enzymes, which were cooled on ice, were considered as a control (100%).

### 2.8.3. Substrate specificity

The substrate specificity of rSAPA and rSAPN was carried using a variety of natural and modified protein substrates as well as esters. The substrate specificity profile of rSAPA and rSAPN was also investigated using some synthetic peptides substrates. Enzymatic activity assays were determined on each substrate according to standard conditions aforementioned [4].

## 2.9. Hydrolysis assessment of shrimp and crab by-products

The degree of hydrolysis (DH) using crustaceans was determined at pH 11 and 70°C for rSAPA and at 75°C and pH 10 for rSAPN. An amount of 2 g of shrimp or crab by-product was dissolved in 100 mL of each appropriate assay buffer and then treated with 2,000 U of each enzyme. The pH was titrimetrically maintained constant by using the pH-Stat set at the desired pH value of each enzyme by continuous addition of 4 N NaOH [12] as given below:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1+10^{pH-pK}} \quad (1)$$

where  $B$  refers to the amount of the base consumed (mL) to keep the pH constant during the reaction,  $Nb$  to the normality of the base,  $MP$  to the mass (g) of protein ( $N \times 6.25$ ), and  $\alpha$  to the average dissociation degree of the  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> groups released during hydrolysis expressed as:

$$D(H) (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 = \frac{B \times Nb}{MP} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \quad (2)$$

where  $pH$  and  $pK$  refer to the values at which the proteolysis was performed and  $h_{tot}$  refers to the total number of peptide bonds in protein substrate (meq.g<sup>-1</sup> of protein for casein;  $h_{tot} = 8.6$ ) [16].

## 2.10. Sanger sequencing, in silico tools, and comparative modeling

The DNA sequencing of the *sapA* and *sapN* genes cloned in *E. coli* strains was done at least three times on direct and reverse strands with the ABI DNA Genetic Analyzer Automated Sequencer 3100. The protein sequence alignments were accomplished through the Blast tools associated with Clustal Omega program and web portals (ExPASy, SWISS-PROT, and TrEMBL). The sequence similarities and secondary structure representation were analysed with the new version 3.0 of Easy Sequencing in Postscript (ESPrpt) web server [17]. The functional protein analyses were conducted using the InterPro database and MEROPS, the peptidase data base from the European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). Molecular enzymatic signatures and conserved motifs were also recognized *via* the InterProScan tool by scanning the SAPN protein sequence against the PRINTS database. The recombinant N-terminal sequences were compared to those in the UniProtKB and SWISS-PROT protein databases. The 3D modeling of Pro-SAPA and Pro-SAPN was achieved with the SWISS-MODEL protein structure prediction tool. The final molecular model was built, analyzed, and visualized using COACH (a meta-server-based approach to protein-ligand binding site prediction) and PyMOL v. 0.99 software.

## 2.11. GenBank sequence depository

The *sapA* (1302 bp) and *sapN* genes (1348 bp) are deposited in the public GenBank repository below accession n°: MH979641 and MT292372, respectively.

## 2.12. Statistical analyses

The tests were executed at least 3 times independently, and the statistical analyses were performed. The results concerning the influence of pH, temperature, and hydrolysis degree on protease activity and stability were deemed to be statistically significant at  $P < 0.05$  and are presented with the standard error ( $\pm$ SE).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Molecular characterization of the *sapA* and *sapN* genes

#### 3.1.1. Sequencing of the *sapA* gene and amino-acid sequence inspection

The investigation of the nucleotide sequence of the *sapA* gene and its flanking DNA regions revealed the presence of an ORF of 1,143 bp that encoded a pre-pro-enzyme, consisting of 381 aa. It is started with an ATG codon at nucleotide position 1 and terminated with a TAA stop codon. The pre-pro-protease organized into three regions. Using the SignalP program, version 3.0 putative signal sequence prediction, we revealed the presence of a signal peptide of 29 aa (87 bp, from the residue of Met1 to the residue of Ala29). This peptide involved in the secretion of the enzyme is composed of a short, positively charged N-terminal sequence (3 Lys) followed by a large hydrophobic central domain of about 20 aa and a C-terminal domain containing a site cleavage (E28-A29-A30) recognized by the peptide signals peptidase. We also identified a sequence of 77 aa (231 bp) from the residue of Asn30 to the residue of Tyr106, which corresponds to the sequence of the pro-peptide. By homology to other serine proteases, we believe that this pro-domain plays a competitive inhibitor role for the enzyme in addition to its primary role in the correct folding of the enzyme. This role of intramolecular chaperone takes place via its IMC-domain and which will subsequently be self-proteolysed to generate the active mature protease of 275 aa (825 bp), ranging from the residue of Ala107 to the residue of Gln381 and having a predicted molecular mass, using the ExPASy server, of 27 905.97 Da. A Shine-Dalgarno-like sequence was observed -12 to -8 bp upstream from the ATG codon. The presumed

putative promoter region, at -42 (TTAACA) and -27 (TATATT) sequences, resembled to the consensus sequences determined for the promoter region by the lambda P<sub>R</sub> RNA polymerase of *E. coli*. In addition, we have spotted the catalytic triad; Asp32, His64 and Ser221 in mature SAPA corresponding to the conserved residues (Signature of subtilases): 28-39, 64-75 and 216-226, characteristic of serine proteases. The SAPA protease has 3881 atoms with an atomic formula of C<sub>1229</sub>H<sub>1913</sub>N<sub>337</sub>O<sub>398</sub>S<sub>4</sub>. SAPA has 17 negatively charged amino acids (Asp + Glu) and it has 13 positively charged amino acids (Arg + Lys) (Table 1). SAPA contains 42 amino acids Asx (16 Asn and 11 Asp), with a percentage of 9.8 mol%, while the SAPB proteases, subtilisin Carlsberg, and subtilisin Novo, and contain 12 respectively; 9.45; and 10.2 mol% of Asx.

This ORF was confirmed as the gene encoding SAPA, since, as determined by the Edman degradation method, the deduced amino-acid sequence was noted to include the 25 NH<sub>2</sub>-terminal amino-acid sequence of SAPA. The *sapA* gene revealed 92% identity with subtilisin BSF1 from *Bacillus subtilis* A26, 95% identity with the sequence of peptidase S8 from *Bacillus subtilis*, 91% identity with subtilisin E from *Bacillus subtilis* WT 168, and 64% identity with subtilisin SAPB from *Bacillus pumilus* CBS [15, 18, 19]. The mature region of alkaline protease SAPA shares amino-acid residues identities of 259/275 (94%), 251/275 (91%), and 200/275 (73%), with the peptidase S8 (PepS8), subtilisin E, and subtilisin SAPB, respectively.

#### 3.1.2. Sequencing of the *sapN* gene and amino-acid sequence inspection

A PCR fragment of about 1.4 kb coding *sapN* gene was cloned within the pCR<sup>TM</sup>-Blunt vector using One Shot<sup>®</sup> TOP10 chemically competent *E. coli* host strain, therefore leading to pMS30, a recombinant vector for DNA sequencing. The *sapN* gene comprised 1140 bp-ORF and encoded a serine alkaline protease (subtilisin SAPN) comprising 379 aa. The 1140 bp-ORF instigated by an ATG codon and terminated by a TAA end codon. An empirical ribosomal binding site (RBS) formed by 4 bp to 9 bp upstream to the initiation site (ATG) and the regulator sequences putative promoter elements, at -35 (ATATTA) and -10 (AATTAT) were identified. This ORF is proven as the gene encoding SAPN, seeing

that the inferred putative amino-acid sequence integrated the 25 aa residues of the NH<sub>2</sub>-terminal residues was the same as determined with Edman's degradation [9].

As stated for the assumed amino-acid residues, SAPN has a recognized pre-pro-sequence domain of 105 aa before maturation to the final subtilisin (274 aa). Indeed, the signal peptide depict to the inceptive 29 aa (from M1 to A2) shows typical features for targeting subtilisins such as a short positive N-terminal sequence (3 Lys) followed by a highly hydrophobic region of about 20 aa and a C-terminal domain containing a site of cleavage (A29-N30-Q31) which is broken by signal peptide peptidase during maturation. The pro-peptide sequence corresponds to 76 aa (from N30 to K105). This pro-domain would play a role of competitive inhibitor for the enzyme in addition to its primordial role in the correct folding of SAPN. In fact, once folding is completed, subtilisin begins an intramolecular chaperone (IMC) degradation to finalize the predecessor's maturation and which will subsequently be auto-proteolysed to generate the active mature subtilisin of 274 aa (A106 to of Q379), with a theoretical mass of 27434.58 Da and pI of 7.18.

Mature SAPN showed over 95.99% identity to subtilisin MP1 (GenBank accession n°: HM147766) with 10 aa of difference (F14D, P17Q, V23G, R77T, S78T, I109G, E147V, I148V, M233I, and G234L). However, SAPN showed 91.94% homology with subtilisin subC (GenBank accession n°: CAA62666.1) from *B. licheniformis* strains with a divergence of 22 aa. In addition, 66.91% of homology (91 aa of difference) with that of protease SAPA from *Anoxybacillus kamchatkensis* M1V and 40.66% homology (162 aa of difference) with that of SAPV produced by *Virgibacillus natechei* FarD<sup>T</sup> were noticed [10, 20]. These enzymes have the same linear order of the catalytic triad. Furthermore, mature SAPN contains conserved essential catalytic triad constituting the active site (D32, H63, and S220) and three conserved subtilisin motifs at positions: 23-42, 59-72, and 217-233 as described by Varshney *et al.*, [21] and confirmed by the InterProScan tool according to the PRINTS database. The presence of three critical residues in the catalytic site which are D32, H63, and S220, and based on statistically significant similarities of the amino-acid sequence with other serine alkaline proteases, SAPN

should be assigned to the S8 subtilisin family. As noticed from resources for information on proteases, subtilisin-like clan of serine alkaline proteases is composed of two distinct families which are subtilases S8 and sedolisins S53. In the S8 family, the catalytic residues are ordered as follows: D32, H63/64, and S220/221. But in the S53 family, H63/64 is substituted by a glutamate residue (E63/64) [22].

It is particularly interesting to note that despite the high similarity percent, SAPN showed some singular feature. It might be deduced that the replacement in mature SAPN form, noted to vary between MP1 and further subtilisins, contributed to upgrading the alkaline pH and thermal stability, as well as the catalytic efficiency of subtilisin. The SAPN has 5480 atoms with an atomic formula of C<sub>1724</sub>H<sub>2733</sub>N<sub>473</sub>O<sub>539</sub>S<sub>11</sub> with an extinction coefficient of 33350 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 280 nm. It contains 37 amino acids Asx (22 Asn and 15 Asp), with a percentage of 9.8 mol%. SAPN has 27 negatively charged amino acids (Asp + Glu) and 32 positively charged amino acids (Arg + Lys) (Table 1).

Table 1  
Amino acid composition of SAPA and SAPN.

Enzyme	SAPA		SAPN	
	Number	(%)	Number	(%)
Ala	34	12.4	55	4.5
Arg	4	1.5	7	1.8
Asn	16	5.8	22	5.8
Asp	11	4	15	4.0
Cys	0	0	0	0.0
Gln	9	3	8	2.1
Glu	6	2.2	12	3.2
Gly	35	12.7	39	10.3
His	6	2.2	8	2.1
Ile	16	5.8	16	4.2
Leu	14	5.1	21	5.5
Lys	9	3.3	25	6.6
Met	4	1.5	11	2.9
Phe	3	1.1	11	2.9
Pro	15	5.5	12	3.2
Ser	33	12	40	10.6
Thr	17	6.2	20	5.3
Trp	4	1.5	2	0.5
Tyr	13	4.7	15	4.0
Val	26	9.5	40	10.6

The protein amino-acid sequence has long been thought to be allied to enzymes thermostability. The statistical analyses highlighted trends toward substitutions such as G→A and K→R. Equally, more charged (17.67%), hydrophobic (45.1%), and aromatic

(9.5%) residues are found in SAPN than in mesophilic subtilisin. As explained in earlier research on thermophilic enzymes, a higher alanine content (14.5%) reflected the fact that alanine was the best helix-forming residue [23].

### 3.2. Homology modeling simulation

To provide an insight into the biochemical properties and further inspect structure-function correlations, the structure model of the SAPA enzyme was built, with the crystal structure of the subtilisin E (PDB ID: 1SCJ) as a template (Figure 4.A). The structure model of the SAPA has a globular configuration with an  $\alpha/\beta$  hydrolase fold with a single compact domain that consists of 9  $\alpha$ -helices and 11  $\beta$ -strands. The core structure consists of nine  $\beta$ -strands  $\beta$ -sheet [ $\beta$ 2- $\beta$ 3- $\beta$ 1- $\beta$ 4- $\beta$ 5- $\beta$ 6- $\beta$ 7- $\beta$ 11- $\beta$ 10] (strand  $\beta$ 10 is anti-parallel) ringed by  $\alpha$ -helices [ $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 8,  $\alpha$ 9, and anti-parallel  $\beta$ 8- $\beta$ 9 strand] on one side and  $\alpha$ -helices  $\alpha$ 4 and  $\alpha$ 5 on the other side. Asp32, His64, and Ser221 are positioned in a catalytic triad-like structure. Whereas no crystal structure has yet been investigated for SAPA, the significantly strong sequence identity of 91% suggests that its 3D structure is likely to be similar to that of subtilisin E (PDB ID: 1SCJ). The model of SAPA was built using the 3D structure of the subtilisin E-pro-peptide. Both proteases shared very analogous overall folding and the root mean square deviation (RMSD) determined after the superposition of their C $\alpha$ -atoms was approximately 0.5 Å.

The available 3D structure of Pro-subtilisin E (PDB ID: 3WHI) displaying 65% sequence identity with Pro-SAPN was used for building the 3D model of Pro-SAPN from *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A<sup>T</sup>. The root-mean-square deviation implying  $\alpha$ -carbons

between the initial and the optimized model was 0.85 Å, which indicates a good degree of similarity of the superimposed model and template; this suggests the reliability of the predicted structure for its use in further studies. The Ramachandran diagram of the final Pro-SAPN model generated using the MolProbity program revealed that 93% of the amino-acids are located in favored regions. The structural model of Pro-SAPN presents a globular form with a characteristic  $\alpha/\beta$  folded hydrolase (Figure 4.B). This structure shows a unique and compact domain having eleven beta-strands and nine alpha-helices. It is arranged in a central structure comprising eight parallel beta-strands namely:  $\beta$ 1- $\beta$ 7,  $\beta$ 11, and the anti-parallel  $\beta$ 10-strand, all bordered by seven alpha-helices, namely  $\alpha$ 1- $\alpha$ 3 and  $\alpha$ 6- $\alpha$ 9, in addition to the anti-parallel  $\beta$ 8- $\beta$ 9-strands on one side and the  $\alpha$ 4- and  $\alpha$ 5-helices on the other side.

In the Pro-SAPN model, two calcium binding sites were predicted by the COACH tool using the 3D structure of Pro-subtilisin E (PDB ID: 3WHI) as template. The Pro-SAPN model shows the first calcium binding site (Ca<sub>1</sub> or high-affinity site), involving the oxygen atoms of 6 potential residues, namely Q2, D41, L75, N77, S79, and V81. In the Pro-subtilisin E (PDB ID: 3WHI), the Ca<sub>1</sub> is hepta coordinate with the oxygen atoms at the vertices of a pentagonal bipyramid. The second calcium binding site (Ca<sub>2</sub> or low-affinity site) potentially involves 3 residues, which are A169, Y171, and V174. The Ca<sub>2</sub> in subtilisin Carlsberg (PDB ID: 2SEC) is presumably occupied by a K<sup>+</sup> ion in subtilisin BPN'. A third calcium binding site in subtilisin Carlsberg (Ca<sub>3</sub>) has a relatively high occupancy and low B factor, but the mean ligand distance of 2.85 Å is again more typical of a K<sup>+</sup> ion.



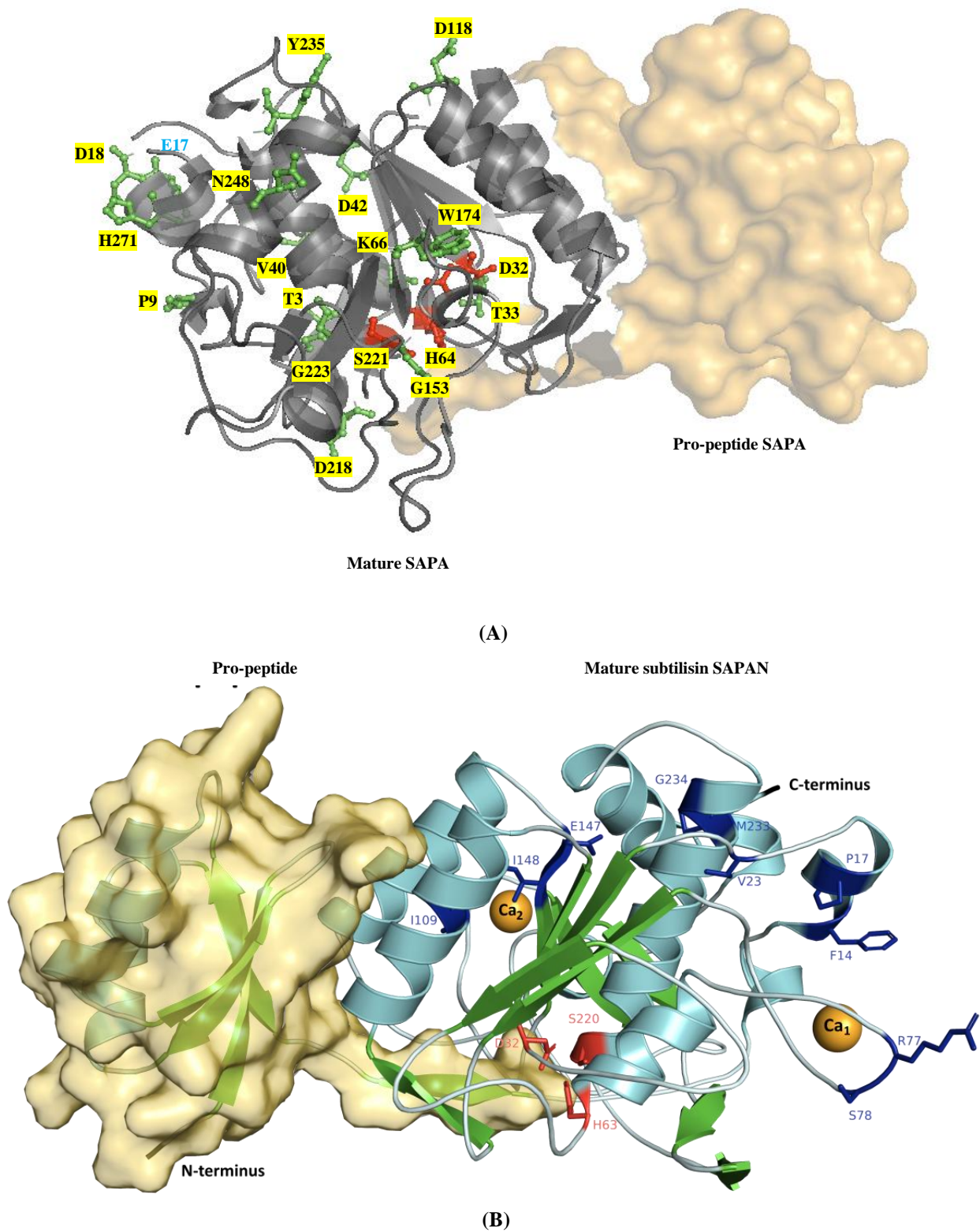


Figure 4: 3D-model of SAPA (A) and SAPN (B)

### 3.3. Genes cloning and expression

To express SAPA and SAPN, the corresponding gene was cloned downstream of *PT7* or *Ptac* promoters then introduced to the *E. coli* strain BL21(DE3)pLysS. The intracellular and periplasmic fractions of all recombinant strains displayed no alkaline protease activity. Relatively high specific activities of 370 U.mg<sup>-1</sup> and 735 U.mg<sup>-1</sup> were, however, detected in the extracellular fractions of BL21(DE3)pLysS/pSM21 and BL21(DE3)pLysS/pSM22, respectively. Again, a relatively high specific activities of 2,517 U.mg<sup>-1</sup> and 9,375 U.mg<sup>-1</sup> were, however, detected in the extracellular fractions of BL21(DE3)pLysS/pSM31, and BL21(DE3)pLysS/pSM32, respectively. Based on this study, SAPA and SAPN were respectively most

efficiently expressed with the *Ptac-sapA* construction (pSM22) and *Ptac-sapN* constructions (pSM32) which were, therefore, retained for the purification of the recombinant proteases (rSAPA and rSAPN). Our previous experimental results also indicated that the strong promoter *Ptrc* expression system allows high-level expression of protease activity [24].

The extracellular rSAPA and rSAPN were purified using the same strategy employed respectively for the native enzyme from *Anoxybacillus kamchatkensis*M1V and *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A<sup>T</sup>. The SDS-PAGE of purified rSAPA (Figure 5.A) and rSAPN (Figure 5.B) enzymes revealed a single band of 28 kDa and 30 kDa, respectively in size with reference to the standard LMW marker, which is similar to the native one. This is due to the absence of post-translational modification in Prokaryotic system.

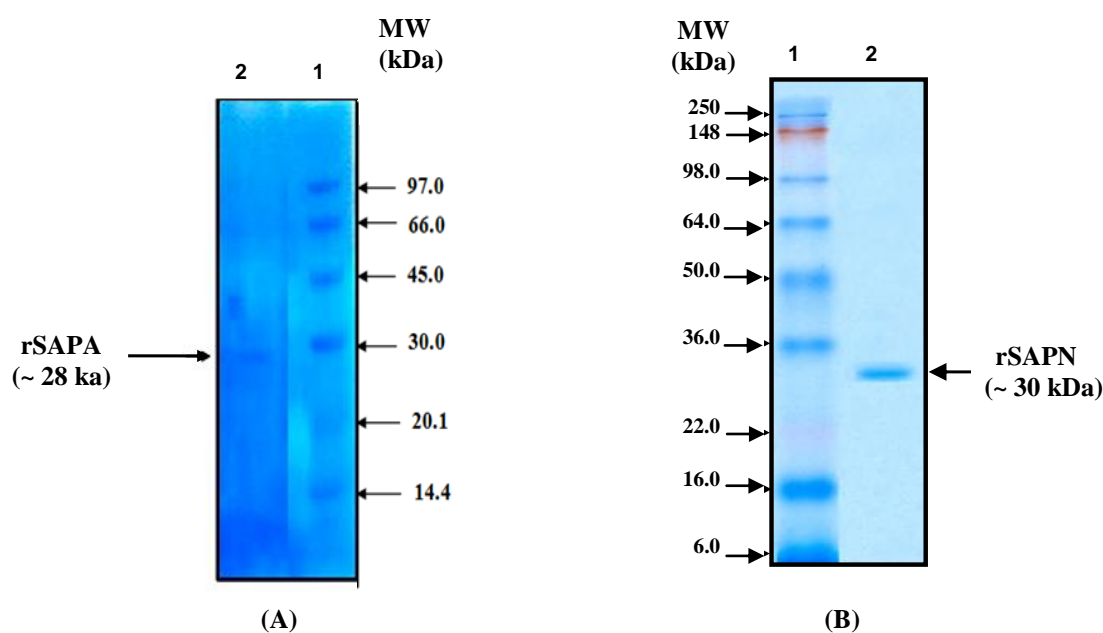


Figure 5: SDS-PAGE of rSAPA (A) and rSAPN (B).

### 3.4. Biochemical characterization of the rSAPA and rSAPN

All the biochemical characteristics identified from rSAPA and rSAPN were almost similar to those of the original enzymes. The large-scale preparation of rSAPA and rSAPN as a biocatalyst for biotechnological application can, therefore, be easily performed and may offer new promising opportunities for the enhancement

of several biotechnological bioprocesses. Particularly, the pH and temperature optima of rSAPA were respectively of 11°C and 70°C. While, the rSAPN showed a optima pH and temperature equal to 10°C and 75°C. The relative rSAPA activity at pH 9 and 10 were, respectively, 90% and 98%. At pH levels of 5 and 6, the rSAPA activity was 25% and 42%, respectively. rSAPA was completely stable in the pH range of 8 to 12.

The half-life times of rSAPA at 60%, 70%, and 80°C increased to 32 h, 22 h, and 14 h in the presence 2 mM CaCl<sub>2</sub>. The pH stability study revealed that rSAPN enzyme was completely stable in a pH range from 7 to 12 at 40°C. rSAPN displayed a half-life of 9 h for SAPN at 80°C. The substrate specificity profile of rSAPA and rSAPN revealed that these enzymes were able to degrade natural substrates with varying degrees. They were more active against casein compared to albumin, gelatin, ovalbumin, and keratin. When assayed with modified protein, these enzymes showed high level of hydrolytic activity with all the substrates tested with highest specificity for azo-casein, albumin azure, and keratin azure, however, displaying no activity towards collagen types I and II-FITC conjugates.

### 3.5. Hydrolysis assessment of shrimp and crab by-products

The potential protein hydrolysis ability of each enzyme was tested by investigating the extent of hydrolysis. As shown in table 2, rSAPN was the most efficient, with 34% protease used respectively during hydrolysis of blue swimming crab and white shrimp. These findings indicate that rSAPN can be useful for the preparation of protein and peptides hydrolysates. In fact, an optimal release of protein from blue swimming crab *Portunus segnis* or white shrimp *Metapenaeus monoceros*, which are two alien species in the Mediterranean Sea, while leaving chitin intact, is a promising industrial and biotechnology opportunity.

Table 2  
Hydrolysis assessment of shrimp and crab by-products

Enzyme	rSAPA		rSAPN	
	Shrimp	Crab	Shrimp	Crab
By-product DH (%)	38	32	29	34

## 4. Conclusions

The gene cloning, amino-acid sequence inspection and homology modeling of two proteases SAPA and SAPN, respectively from M1V and Nari2A<sup>T</sup> strains has been well detailed in this study. These recombinant enzymes are endowed with some attribute that are deeply appreciated for biotechnology applications. The structural interpretation provided insights into the catalytic mechanism of rSAPA and rSAPN. In view of the outstanding traits and properties of rSAPA and

rSAPN, additional studies of these enzymes, especially at the structure-function relationship level, are needed. The exploration of the scale-up production and the storage stability of rSAPA and rSAPN under lyophilized and atomized forms are also required. Finally, the immobilization of these activities within organic and hybrid supports be the next challenges.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Mrs. N. Masmoudi and Mr. K. Walha ([Analysis Unit-CBS](#))<sup>12</sup> for their technical assistance.

## Funding information

This work was supported by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS)" in Tunisia in the framework of the Contract Programs LBMIE-CBS, code grant no.: LR15CBS06 (2015-2018) and LBMEB-CBS, code grant no.: LR19CBS05 (2019-2022), the Multilateral Project Partenariats Hubert Curien (PHC)-Maghreb 2020 Program (FranMaghZYM 2020-2023, code Campus France: 43791TM & code PHC: 01MAG20), and the Algerian-Tunisian R&I Cooperation for the Mixed Laboratories of Scientific Excellence 2021-2024 (Hydro-BIOTECH, code LABEX/TN/DZ/21/01).

## References

1. Ouelhadj, A.; K. Bouacem; K.-L. Asmani; F. Allala; S. Mechri; M. Yahiaoui; B. Jaouadi. Identification and homology modeling of a new biotechnologically compatible serine alkaline protease from moderately halotolerant *Gracilibacillus boraciiitolerans* strain LO15. *Int. J. Biol. Macromol.*, 161 (2020): 1456-1469. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.266>
2. Rahem, F.; A. Badis; B. Zenati; S. Mechri; R. Hadjidj; H. Rekik; K. Eddouaouda; R. Annane; B. Jaouadi. Characterization of a novel serine alkaline protease from *Bacillus atrophaeus* NIJ as a thermophilic hydrocarbonoclastic strain and its application in laundry detergent formulations. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*, 7 (2021):1707-1724. Available on: <https://www.aljest.org/index.php/aljest/article/view/365>
3. Benmradi, M.O.; W. Gargouri; D. Mahfoudh; M. Kriaa; B. Jaouadi; N. Kechaou. Response surface methodology optimization of milk-clotting protease produced by *Pleurotus sajor-caju* strain CTM 10057 and its technico-economical evaluation. *Algerian Journal of Environmental Science and*

<sup>12</sup> <http://www.cbs.rnrt.tn/eng/home>

- Technology 6 (2020):1658-1666. Available on: <http://www.aljest.org/index.php/aljest/article/view/360>
4. Mechri, S.; M. Ben Elhouel Berrouina; M. Omrane Benmradi; N. Zaraq Jaouadi; H. Rekek; E. Moujehed; A. Chebbi; S. Sayadi; M. Chamkha; S. Bejar; B. Jaouadi. Characterization of a novel protease from *Aeribacillus pallidus* strain VP3 with potential biotechnological interest. International Journal of Biological Macromolecules 94 (2017) 221-232. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.112>
  5. Singh, R.; M. Kumar; A. Mittal; P.K. Mehta. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century.3 *Biotech* 6 (2016) 174. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
  6. Mechri, S.; I. Sellem; K. Bouacem; F. Jabeur; M. Chamkha; H. Hacene; A. Bouanane-Darenfed; B. Jaouadi. Antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Metapenaeus monoceroides* by-product hydrolysates elaborated by purified alkaline proteases. Waste Biomass Val., 11 (2020)6741-6755. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00942-5>
  7. Mechri, S.; M. Kriaa; M. Ben Elhouel Berrouina; M. Omrane Benmradi; N. Zaraq Jaouadi; H. Rekek; K. Bouacem; A. Bouanane-Darenfed; A. Chebbi; S. Sayadi; M. Chamkha; S. Bejar; B. Jaouadi. Optimized production and characterization of a detergent-stable protease from *Lysinibacillus fusiformis* C250R. Int. J. Biological Macromol., 101 (2017): 383-397. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00942-5>
  8. Daoud, L. ; M. Ben Ali, Chapter 5 - Halophilic microorganisms: Interesting group of extremophiles with important applications in biotechnology and environment. In: Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles, R. Salwan ;V. Sharma, 2020, 5<sup>th</sup> edition, Academic Press. 51-64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00005-8>
  9. Mechri, S.; K. Bouacem; F. Jabeur; S. Mohamed; N.A. Addou; A. Dab; A. Bouraoui; A. Bouanane-Darenfed; S. Bejar; H. Hacène; L. Baciou; F. Lederer; B. Jaouadi. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable and halotolerant subtilisin SAPN, a serine protease from *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A<sup>T</sup> for chitin extraction from crab and shrimp shell by-products. Extremophiles, 23 (2019) 529-547. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01105-8>
  10. Mechri, S.; K. Bouacem; N. Zaraq Jaouadi; H. Rekek; M. Ben Elhouel; M. Omrane Benmradi; H. Hacene; S. Bejar; A. Bouanane-Darenfed; B. Jaouadi. Identification of a novel protease from the thermophilic *Anoxybacillus kamchatkensis* M1V and its application as laundry detergent additive. Extremophiles, 23 (2019): 687-706. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01123-6>
  11. Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISSN: 1940-3402.
  12. Zaraq Jaouadi, N.; B. Jaouadi; N. Aghajari; S. Bejar. The overexpression of the SAPB of *Bacillus pumilus* CBS and mutated *SapB-L311/T33S/N99Y* alkaline proteases in *Bacillus subtilis* DB430: New attractive properties for the mutant enzyme. Bioresource Technology, 105 (2012): 142-51. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.115>
  13. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72 (1976): 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
  14. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 (1970): 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
  15. Jaouadi, B.; S. Ellouz-Chaabouni; M. Rhimi; S. Bejar. Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. Biochimie, 90 (2008): 1291-1305. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.03.004>
  16. J. Adler-Nissen, Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London, 1986. ISBN 100853343861
  17. Gouet, P.; X. Robert; E. Courcelle. ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. Nucleic Acids Research, 31 (13)(2003): 3320-3323. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg556>
  18. Takagi, H.; T. Maeda; I. Ohtsu; Y. C. Tsai; S. Nakamori. Restriction of substrate specificity of subtilisin E by introduction of a side chain into a conserved glycine residue. FEBS Letters, 395 (1996): 127-132. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)01014-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)01014-9)
  19. Agrebi, R.; A. Haddar; N. Hmidet; K. Jellouli; L. Manni; M. Nasri. BSF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: Purification, biochemical and molecular characterization. Process Biochemistry, 44 (11)(2009): 1252-1259. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.024>
  20. Mechri, S.; K. Bouacem; M. Amziane; A. Dab; F. Nateche; B. Jaouadi. Identification of a New Serine alkaline peptidase from the moderately halophilic *Virgibacillus natechei* sp. nov., "strain FarD<sup>T</sup> and its application as bioadditive for peptide synthesis and laundry detergent formulations. BioMed Research International, 2019(2019): 1-17. <https://doi.org/10.1155/2019/6470897>
  21. Varshney, D.; A. Jaiswar; A. Adholeya; P. Prasad. Phylogenetic analyses reveal molecular signatures associated with functional divergence among subtilisin like serine proteases are linked to lifestyle transitions in Hypocreales. BMC Evolutionary Biology, 16 (1)(2016): 220. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0793-y>
  22. Laskar, A.; E. Rodger; A. Chatterjee; C. Mandal. Modeling and structural analysis of evolutionarily diverse S8 family serine proteases. Bioinformatics, 7 (2011): 239-45. <https://doi.org/10.6026/97320630007239>
  23. Vieille, C. ; G.J. Zeikus. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65 (2001): 1-43. <https://doi.org/10.1128/mmb.65.1.1-43.2001>



Soumis le : 13/01/2021

Forme révisée accepté le: 16/05/2021

Auteur Corespondant : [hamadikamel@yahoo.fr](mailto:hamadikamel@yahoo.fr)



**Revue  
Nature et Technologie**

<http://www.univ-chlef.dz/revuenatec>

ISSN : 1112-9778 – EISSN : 2437-0312

# Étude de l'activité biologique de l'huile essentielle de l'Origan (*Origanum glandulosum* L.) sur l'histophysiologie du tube digestif des adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775)

Kamel HAMADI <sup>a,\*</sup>, Amel BOUDJENOUIA <sup>b</sup>, Nassima KACI <sup>b</sup> et Bahia DOUMANDJIMITICHE <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Dynamique et Biodiversité, Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Alger, Algérie.

<sup>b</sup> Université M'hamed Bougara, Faculté des Sciences, Département d'Agronomie, Boumerdes, Algérie.

<sup>c</sup> École Nationale Supérieure Agronomique, Département de Zoologie agricole et forestière, Alger, Algérie.

## Résumé

L'étude de l'activité biologique de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* sur les adultes de *Schistocerca gregaria* a révélé un effet acaricide très élevé. La substance testée a été administrée par gavage ou forçage buccale. La mortalité totale des individus traités a été obtenue au bout de 2 jours. L'observation de l'aspect externe du tube digestif des individus testés ne révèlent aucune altération. L'examen histologique de la paroi intestinale de l'espèce étudiée a mis en évidence l'effet très intense de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* sur le tube digestif comparativement aux témoins. Celle-ci agit efficacement sur le stomodeum provoquant des ulcérations, des ruptures au niveau de l'épithélium, ce qui engendre des rétrécissements musculaires. Au niveau du mésentéron l'huile essentielle d'Origan induit une modification de l'aspect épithélial qui devient granuleux et la lyse de la membrane péritrophique.

Mots-clés : Activité biologique ; *Origanum glandulosum* ; *Schistocerca gregaria* ; Tube digestif ; Histophysiologie.

## Study of the biological activity of the Oregano (*Origanum glandulosum* L.) essential oil on the histophysiology of the digestive tract of adults of *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775)

### Abstract

The study of the biological activity of the essential oil of *Origanum glandulosum* on adults of *Schistocerca gregaria* revealed a very high acaricidal effect. The test substance was administered by gavage or oral forcing. The total mortality of the treated individuals was obtained after 2 days. Observation of the external appearance of the digestive tract of the individuals tested did not reveal any alteration. Histological examination of the intestinal wall of the species studied revealed the very intense effect of the essential oil of *Origanum glandulosum* on the digestive tract compared to controls. This acts effectively on the stomodeum causing ulcerations, ruptures in the epithelium, which causes muscle strictures. At the level of the mesenteron, the essential oil of Oregano induces a modification of the epithelial appearance which becomes granular and lysis of the peritrophic membrane.

Keywords: Biological activity; *Origanum glandulosum*; *Schistocerca gregaria*; Digestive tract; Histophysiology

## 1. Introduction

Depuis des siècles, les invasions de *Schistocerca gregaria* se sont succédées à un rythme élevé [1]. En matière de lutte contre les locustes, le problème de *Schistocerca gregaria* n'est pas encore résolu, sachant qu'elle présente un habitat permanent étant solitaire et

un autre beaucoup plus vaste étant grégaire. Ce dernier est plus difficile à contrôler de façon efficace [2]. En 1986, 35 millions de Dollars ont été consacrés à la lutte contre les criquets dans différents états du SILSS (Comité inter-états de Lutte contre la Sécheresse dans le Sahel) [3]. Les conséquences de la lutte chimique sur la santé humaine et sur



Ceci est un document en libre accès selon les termes de [Creative Commons Attribution License CC-BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), ce qui permet de le partager, copier, reproduire, distribuer, communiquer, réutiliser ou de l'adapter avec l'obligation de créditer son auteur.

l'environnement suscitent une demande croissante pour des nouvelles méthodes de lutte, ce qui justifie l'adoption de la lutte biologique qui correspond à l'utilisation d'organismes et/ou composés naturels pour détruire ou contrôler d'autres organismes nuisibles sur le plan agronomique ou au niveau des espaces naturels. De même, plusieurs chercheurs ont prouvé que certaines plantes ont des capacités naturelles de réduire la portée des dommages auxquels elles peuvent être soumises. Des défenses mécaniques comme des épines peuvent empêcher les herbivores de grande taille de dévorer le feuillage. Mais dans d'autres cas ce sont des produits chimiques présents dans les tissus végétaux qui peuvent intoxiquer les espèces phytophages nuisibles [4]. En conséquence, de nouveaux produits d'origine végétale sont de plus en plus recherchés pour, d'une part, assurer une protection efficace de la production agricole et, d'autre part, contribuer au développement d'une agriculture durable [5]. Nous avons choisi une plante acridifuge de famille botanique des Lamiaceae à tester sur *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775). Il s'agit de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* (Desf). Notre expérimentation consiste à vérifier l'effet de l'huile essentielle de cette plante sur l'histophysiologie du tube digestif de l'acridien testé.

Nous voulons apporter notre contribution dans la lutte contre ce ravageur, en vérifiant l'action et l'activité de cet agent biologique sur l'histophysiologie du tube digestif de cet insecte.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Choix de l'insecte

Le criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria*) (Forskål, 1775) a fait objet de cette expérimentation, car il s'agit d'une espèce considérée depuis longtemps comme le principal ravageur pour de nombreux pays d'Afrique et du proche et du moyen orient (Figure 1).



Figure 1. Adulte de *S. gregaria* (Forskål, 1775).

Nous avons travaillé sur les adultes du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Orthoptera, Cyrtacanthacridinae) issus d'un élevage de masse au service d'acridologie de l'[Institut National de Protection des Végétaux d'El Harrach](https://www.inpv.edu.dz/)<sup>1</sup>.

### 2.2. Choix de la plante acridifuge utilisée

La plante choisie pour notre expérimentation est *Origanum glandulosum* appelé communément l'Origan<sup>2</sup> appartient à la famille des Lamiacées. C'est une plante herbacée, sous-ligneuse à la base. La première inflorescence est en épis réunis en inflorescences composées

Cette plante est utilisée dans les préparations culinaires et est considérée essentiellement comme une plante médicinale pour traiter les maladies sévères [6]. Présentant ainsi des propriétés antitussif, aromatique, calmant, carminatif, digestif, tonique et antiseptique [7]. Les principaux constituants de l'huile essentielle d'Origan sont : thymol, carvacrol, linalol, bornéol, pinène, caryollène, résine, flavonoïdes, stérol ... ; et le pourcentage des constituants majoritaires sont : la carvacrol (41,1 %), le thymol (26,4 %), le p-Cyméné (9,7 %) [8].

L'extrait de l'huile essentielle de l'Origan utilisé dans notre expérimentation est obtenu par la méthode d'hydrodistillation réalisée au niveau du laboratoire de chimie de l'[École Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach](https://www.ensa.dz/)<sup>3</sup>.

### 2.3. Méthode de traitement des individus de *S. gregaria*

L'expérience se déroule au [laboratoire de l'entomologie](https://www.lobem.usthb.dz/)<sup>4</sup> de la Faculté des Sciences Biologique de l'Université des Sciences et de Technologie Houari Boumediene de Bab Ezzouar. Le principe consiste à mettre les individus à tester dans les mêmes conditions d'expérimentation. Ils sont placés dans une salle où la température ambiante est entre 25 et 30 °C. La photopériode et l'humidité relative de l'air ne sont pas régulées.

Le principe de cette expérimentation consiste à

<sup>1</sup> <https://www.inpv.edu.dz/>

<sup>2</sup> Zâateur en arabe

<sup>3</sup> <http://www.ensa.dz/>

<sup>4</sup> <https://lobem.usthb.dz/>



mettre les individus de *S. gregaria* individuellement dans des cages pendant 24 heures pour qu'ils vident leur tube digestif des aliments déjà pris. Le test concrétisé consiste à faire subir un forçage buccal (ou le gavage) aux acridiens testés en leur faisant ingérer une goutte de 0,1 mL de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*. Il est à préciser que le témoin a subi lui aussi un forçage buccal en lui ingérant 0,1 mL d'eau distillé. Pour chaque test, une étiquette est collée sur chaque cage où le nom de l'espèce est mentionné, la plante testée, la date et l'heure du début traitement. Un total de 20 individus de *S. gregaria* a été utilisé dans notre expérimentation, soit 10 individus pour chaque test.

### 3. Méthode d'étude histologique du tube digestif de l'acridien testé

L'objectif de cette étude est de réaliser des coupes histologiques au niveau du tube digestif des témoins et des traités pour établir une comparaison, et mettre en évidence les effets toxiques de l'extrait de l'huile essentielle de la plante acridifuge testée. Les différentes étapes de cette étude sont réalisées suivant la méthode de Martoja et Martoja [9] (Annexe). Les montages des coupes histologiques, une fois réalisés, sont conservés pour être ensuite observés sous microscope photonique. Des photographies seront prises à l'aide d'un appareil photographique numérique.

### 4. Résultats

Les observations relatives aux comportements des individus testés du début de notre expérimentation jusqu'à leur mortalité sont comme suit :

- Les individus témoins sont calmes et se nourrissent régulièrement ;
- Les individus traités par l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* manifestent une excitation des pièces buccales avec des frottements successifs des pattes. La mortalité du premier individu a été enregistrée après 5 h 17 min, et au bout de 2 jours nous avons noté la mortalité de tous les individus.

Aucune altération n'a été observée sur l'aspect externe des tubes digestifs des individus traités par l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*. Cependant, les montages des coupes histologiques du

tube digestif des individus témoins et traités ont été observés sous microscope photonique. Plusieurs altérations histologiques ont été enregistrées chez les traités prouvant l'effet intense de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* sur les différents compartiments du tube digestif. Les résultats obtenus sont comme suit :

#### 4.1. Stomodium de *Schistocerca gregaria* témoin

Le stomodeum du témoin présente une forme arrondie avec une lumière intestinale large pleine contenant un bol alimentaire. De l'intérieur vers l'extérieur, la paroi intestinale est composée d'une cuticule présentant trois couches : épicuticule, exocuticule et endocuticule. L'épicuticule émet des épines apparentes qui servent à triturer les aliments. Les villosités sont nombreuses, condensés et d'une longueur presque identique. L'épithélium vient en dessous de la cuticule, simple, unistratifié, composé de plusieurs cellules cubiques juxtaposées adhérant la membrane basale du tissu conjonctif. La gaine musculaire est très développée. Elle est formée d'une couche circulaire externe très épaisse et d'amas de muscles longitudinaux internes (Figure 2).

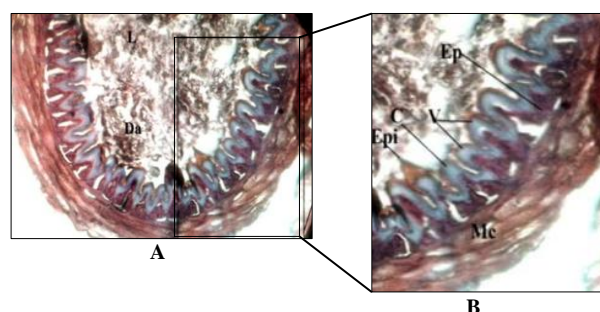


Figure 2 : Coupe transversale au niveau du stomodeum de *Schistocerca gregaria* témoin.

A : Vue d'une portion du stomodeum témoin (Gr.×160) ;

B : Détails d'une portion du stomodeum (Gr.×400) ;

L : Lumière ; C : Cuticule ; V : Villosité ; Mc : Muscles circulaires ;

Ep : Épithélium ; Da : Débris alimentaires ; Epi : Épines.

Fixateur : Bouin aqueux ; Coloration : Azan de Heidenheim.

#### 4.2. Stomodeum des individus de *S. gregaria* traités par l'huile d'Origan

Le stomodeum des acridiens traité par l'huile d'Origan avec la méthode de gavage montre des altérations au niveau des villosités dont certaines parties sont complètement détruites. Des ulcérations sont

observées, dues à l'effet toxique de l'huile d'Origan qui a causé la dégénérescence des cellules épithéliales provoquant ainsi des ruptures de celle-ci dans différentes parties du stomodeum. De ce fait, les muscles circulaires dans certaines portions se trouvent en contact direct avec la lumière contenant l'huile, ce qui engendre un rétrécissement musculaire à ce niveau et un relâchement total des deux tuniques musculaires (Figure 3).

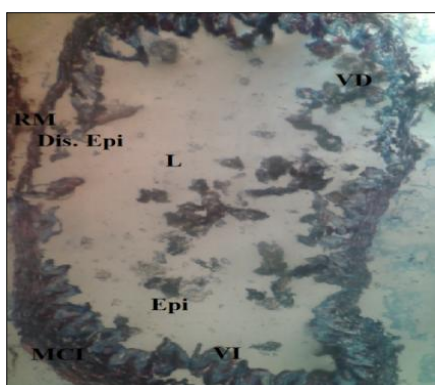


Figure 3 - Coupe transversale au niveau du stomodeum des individus de *S. gregaria* traité par l'huile d'Origan (Gr x 160).

VD : Villosités Détruite ; VI : Villosités Intacts ;  
RM : Rétrécissement Musculaire ; Epi : Épithélium ;  
Dis. Epi : Disparition Épithéliale ; MCI : Muscles  
Circulaires Intacts ;  
Fixation : Bouin aqueux ; Coloration : Azan de  
Heidenhein.

#### 4.3. Mésentéron de *Schistocerca gregaria* témoin

Le mésentéron est la portion du tube digestif responsable de l'absorption de tous les éléments nutritifs de l'aliment ingéré par l'acridien. La structure histologique du mésentéron paraît très différente de celle du stomodeum. Il est d'une forme allongée constitué d'une lumière large. L'épithélium de revêtement de la sphère intestinale est de type pseudostratifié, souvent plissé, dont les petites cellules sont dites de régénérations. Les cellules épithéliales portent à leur pôle apical une bordure en brosse très

régulière. Cette partie du tube digestif est remarquable par la membrane péritrophique sélective autour du bol alimentaire et par l'absence de la cuticule. La musculature est très réduite présentant des îlots musculaires longitudinaux externes (Figure 4).

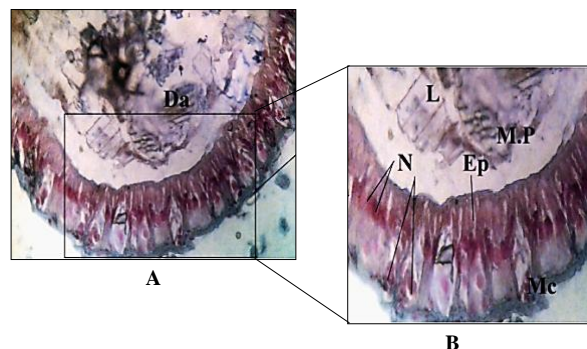


Figure 4. Coupe transversale au niveau du mésentéron de *Schistocerca gregaria* témoin.

A : vue d'ensemble du mésentéron témoin (Gr x 250) ;  
B : Détail d'une portion de mésentéron (Gr x 400) ;  
L : Lumière ; Ep : Épithélium pseudostratifié ; MC : Muscles  
circulaires ; N : Noyaux médian ou parabasal, Da : Débris  
alimentaires ; M.P : Membrane Péritrophique ; Fixateur : Bouin  
aqueux ; Coloration : Azan de Heidenhein.

#### 5. Le mésentéron des individus de *S. gregaria* traités par l'huile d'Origan

6. Nous remarquons au niveau du mésentéron de *S. gregaria* que l'huile d'Origan a provoqué la destruction de sa membrane péritrophique ainsi que la dégradation totale de la bordure en brosse des cellules épithéliales. Nous notons cependant l'apparition des ulcérations dus à des ruptures au niveau de la couche épithéliale qui apparaît très granuleuse, et dans certains endroits ces cellules sont fortement vacuolisées. Le diamètre de cette portion du tube digestif paraît supérieur à celui du témoin résultant probablement d'un relâchement de l'assise musculaire, provoqué par l'action de l'huile essentielle d'Origan sur la tunique musculaire circulaire, rendu très atrophiée par rapport à celle observée chez le témoin (Figure 5).



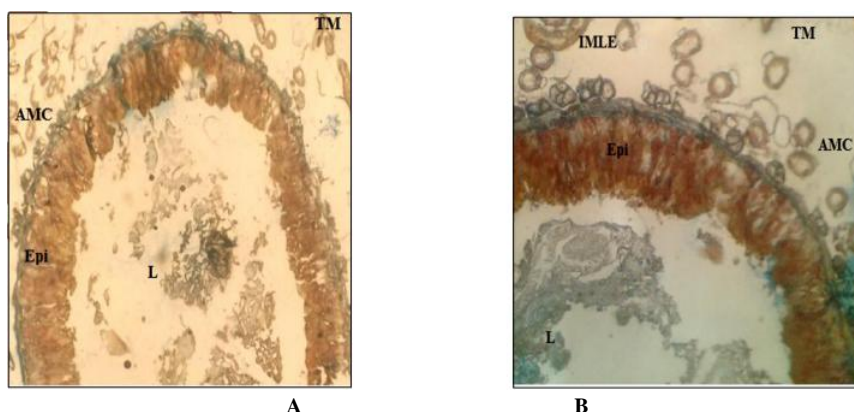


Figure 5 - Coupe transversale au niveau du mésentéron des individus de *S. gregaria* traités par l'huile d'Origan.  
 A : Le mésentéron (Gr x 160). L : Lumière ; Epi : Épithélium ; AMC : Assise de Muscles Circulaires interne ; TM : Tube de Malpighi.  
 B : Détail d'une portion du mésentéron (Gr x 400). IMLE : Îlots de Muscles Longitudinaux Externes.  
 Fixation : Bouin aqueux ; Coloration : Azan de Heidenheim.

## 7. Discussion

L'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* a présenté un effet très fort sur l'acridien. Les individus traités manifestent des excitations des pièces buccales qui sont frottées continuellement par les pattes antérieures. La mortalité totale des traités est obtenue au bout de 2 jours. Duranton et Lecoq [3], signalent que l'utilisation de substances qui peuvent être acridicides, acridifuges ou antiappétantes contenues dans les plantes, peuvent avoir une activité biologique causant des altérations irréversibles chez l'insecte. Lors de la dernière invasion acridienne (2003-2006), il a été constaté que certaines plantes du Sahara septentrional (est algérien) sont épargnées par le Criquet pèlerin, parmi lesquelles deux plantes *Peganum harmala* L. (*Zygophyllaceae*) et *Cleome arabica* L. (*Capparidaceae*) [10].

Des recherches ont prouvé que plusieurs substrats alimentaires ont été parfaitement acceptés par le criquet pèlerin, alors qu'ils ont des effets qui varient en fonction du végétal, du stade du développement de l'insecte et du mode de l'administration de l'aliment. En alimentation directement sur végétal frais, le Bigaradier agit en retardant la ponte et en réduisant la fécondité. Les feuilles d'Olivier et le faux poivrier entraînent une stérilité chez la femelle avec maintien de l'aspect d'insectes immatures. Quant au Cestreau, il semble être toxique à tous les stades de développement de l'insecte [2]. L'effet de l'alimentation en *Peganum harmala* L. (*Zygophyllaceae*) sur criquet pèlerin provoque une mortalité aux stades larvaires d'un taux

de 45 % et un blocage du développement ovarien chez les femelles [11,12].

Généralement le criquet explore la surface de la feuille avant de mordre. Le rejet du végétal s'effectue habituellement après morsure [13]. Hamadi et Doumandji-Mitiche [13], précisent que l'activité biologique de l'extrait de *Dittrichia viscosa* (L.) (*Asteraceae*) et de *Salvia officinalis* L. (*Lamiaceae*) sur *Aiolopus strepens*, a révélé une action totalement dissuasive qui se répercute sur la prise de nourriture. Les mêmes auteurs ont constaté que l'activité de ces substances augmente d'autant que leur concentration s'élève [14]. La présence d'une substance active n'est pas le seul déterminant. Sa concentration dans l'organe végétal est un point capital dans la réalisation du blocage de la prise de nourriture.

Kemassi *et al.* [10] ont travaillé sur l'activité biologique des huiles essentielles de *Peganum harmala* L. et de *Cleome arabica* L. sur *Schistocerca gregaria* et ont observé chez les individus traités de cette espèce des troubles de l'équilibre, des mouvements convulsifs, défécation intense, perte de la capacité de se percher à un support, tremblements d'appendices et accroissement de rythme respiratoire. Ces symptômes témoignent de l'effet neurotoxique de ses extraits végétaux sur ces acridiens.

Les individus de *S. gregaria* traités par l'huile essentielle de l'Origan ne manifestent aucune tentation pour s'alimenter. Quelques heures après le traitement, ils restent immobiles, très affaiblis par l'effet de l'huile de cette plante. Raccaud-Scholler, signale que le temps

requis pour le passage des aliments le long du tube digestif est variable selon les insectes [15].

L'observation sous loupe binoculaire du tube digestif des individus de *S. gregaria* traités ne révèlent aucune altération anatomique. Les trois parties du tube digestif, stomodeum, mésentéron et proctodeum, sont identiques à celles observées chez les témoins. Aucune lésion macroscopique n'a été observée à ce niveau.

Les résultats obtenus après dissection des individus témoins du Criquet pèlerin montrent que sur le plan histologique, le tube digestif, de ces derniers, concorde à celui décrit dans la littérature [15-17]. Par ailleurs, les observations au microscope photonique des coupes histologiques réalisées sur le tube digestif des individus traités ont révélé des modifications très prononcées. Les acridiens traités par l'huile d'Origan, les altérations observées au niveau du stomodeum se traduisent par l'apparition d'ulcérations suite à la destruction des villosités et de l'assise épithéliale. De ce fait, le contact des fibres musculaires avec l'huile d'Origan a provoqué un amincissement à ce niveau.

L'intestin moyen ou le mésentéron est la portion la plus active du tube digestif en ce qui concerne l'absorption des éléments nutritifs. Cette partie est facilement reconnaissable par l'absence à ce niveau de l'intima cuticulaire et par la présence d'une mince membrane péritrophique sélective.

L'observation au microscope photonique des coupes histologiques du mésentéron des individus traités par l'huile d'Origan résident dans la lyse de la membrane péritrophique et dans l'altération de la bordure en brosse. L'assise épithéliale montre un aspect granuleux, des espacements entre les cellules et dans certains endroits celles-ci apparaissent très vacuolisées. La tunique musculaire circulaire interne est très mince par rapport à celle observée chez le témoin. Ces effets concordent avec ceux provoqués par *Azedarachta indica* [18] et *P. harmala* [19] sur le tube digestif de *S. gregaria*. Ces derniers montrent qu'ils ont fréquemment observé la présence de grégarines protozoaires surtout vers l'épithélium intestinal où quelquefois la pointe de ces organismes y pénètre. Les mêmes auteurs rajoutent que ces organismes sont peu observés au milieu de la lumière intestinale. Il semble toutefois qu'ils soient plus nombreux chez les individus témoins que chez les individus nourris avec *P. harmala*. Pour notre cas, aucune grégarine protozoaire n'a été

observée au niveau des coupes histologiques des témoins ou des traités.

La plante testée sur *S. gregaria* a provoqué des effets incontournables au niveau des compartiments du tube digestif. Différentes altérations ont été constatées au niveau de la paroi intestinale et précisément sur l'assise épithéliale, qui a subi des lésions importantes. La destruction de celle-ci bloque le rôle d'absorption des éléments nutritifs. Ce qui affaiblit l'acridien et provoque sa mort.

Mordue *et al.* [20], rapportent que l'azadirachtine citée comme phagorépuif, est aussi un toxique qui diminue la motilité du tube digestif, ralentit la croissance et perturbe la mue. L'action de l'extrait foliaire du Laurier rose (*Nerium oleander*) sur les variations pondérales et la mortalité chez les différents stades larvaires et les imagos de *Locusta migratoria*, montre que la prise de nourriture est inhibée par toutes les doses et le taux de mortalité varie d'une dose à une autre. La plus forte dose a causé une mortalité de 55,55 % après 10 jours de traitement [21]. De même, Kemassi *et al.* [22], rapportent que, la toxicité par contact des huiles essentielles de *Cymbopogon schoenanthus* L. (Poaceae) récoltée dans la région d'Illizi<sup>5</sup>, a provoqué chez les larves L5 de *S. gregaria*, une mortalité de 100 % au bout de 35 mn 11 sec. Chez les adultes la mortalité de 100 % est atteinte au bout de 63 mn 19 sec. De même, les larves de *S. gregaria* nourries avec les feuilles de *Nerium oleander* (Apocynaceae), ont révélé des troubles de prise de nourriture et de la mue. Le transit intestinal des individus traités est plus long que celui des témoins alimentés avec *Brassica oleracea*. 50 % de mortalité est obtenue au bout du 4<sup>ème</sup> jour et la mortalité totale au bout de 12 jours [23].

## 8. Conclusion

La présente étude a mis en évidence l'effet acridicide très poussé de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* sur les adultes de *Schistocerca gregaria*. Les individus traités par cette substance ont manifesté des troubles de mouvements et de l'excitation des pièces buccales et des pattes antérieures qui sont frottées continuellement. La mortalité de tous les individus traités est obtenue au bout de deux jours.

<sup>5</sup> Sahara central de l'Algérie



Après dissection des individus traités, aucune lésion sur l'aspect externe du tube digestif n'a été notée. Les observations microscopiques de l'aspect histologique de la sphère digestive ont révélé plusieurs altérations histologiques qui se manifestent surtout au niveau du stomodeum et du mésentéron par des ulcérations, des ruptures au niveau de l'épithélium, des rétrécissements musculaires et par la lyse de la membrane péritrophique mésentérale. Il serait ainsi très intéressant de reconduire cette étude en effectuant des tests sur d'autres espèces acridiennes d'intérêt agronomique, telle que *Locusta migratoria*, et d'envisager son utilisation sur terrain en tant que substance naturelle, qui reste sans effet sur l'environnement en générale et sur la faune entomique en particulier.

## Références

- [1] PRIFAS, Principales activités et publications du Prifas en 2001, Acridologie Opérationnelle, CIRAD-amis, Montpellier, (2001) 15. <https://agritrop.cirad.fr/490082/>
- [2] Ben Hamouda M.H., Recherche sur l'effet d'extraits de plantes sur l'alimentation et le développement du criquet pèlerin : perspectives et développements. Atelier international FAO sur la recherche et la planification de la lutte contre le criquet pèlerin, Tunis, (S. D.) 8.
- [3] Lecoq M., Les criquets du Sahel. Coll. Acr. Opérat., n°1, CIRAD-PRIFAS, Montpellier, (1988) 129p.
- [4] Mouffette Y., La résistance des plantes et la production de tanins. pp 627 – 645. In C. Vincent, D. Coderre. La lutte biologique. Ed. Gaëtan Morin, Québec, (1992) 671.
- [5] Meftah H., Boughdad A., Bouchelta A., Effet biocide des extraits aqueux bruts de *Capsicum frutescens*, *Melia azedarach* et *Peganum harmala* sur *Euphyllura olivina* Costa (Homoptera, Tiséridae). Tiré-à-part : H. Meftah Psyllidae en verger. Cah Agric 20 (2011) : 463-7. <https://doi.org/10.1684/agr.2011.0531>
- [6] Bekhchi C., Atik Bekkara F., Abdelouahid D.E., Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. Phytothérapie, 6 (2008) : 153-159. <https://doi.org/10.1007/s10298-008-0310-6>
- [7] Baba Aïssa F., Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Ed. Librairie Moderne, Rouiba, (1999) 159.
- [8] Belyagoubi M.L., « Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détériorations des céréales » Thèse Magister, Université Abou Bakr Belkaïd, (2005) 110. Disponible en ligne : <http://dspace.univ-tlemcen.dz/handle/112/6695>
- [9] Martoja R., Martoja M., Initiation aux techniques de l'histologie animale. Ed. Masson et Cie, Paris, (1967) 339.
- [10] Kemassi A., Bouziane N., Boual Z., Ould El Hadj M.D., Activité biologique des huiles essentielles de *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) et de *Cleome arabica* L. (Capparidaceae) sur *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775). Phytothérapie, 12 (2014) : 348-353. <https://doi.org/10.1007/s10298-014-0894-y>
- [11] Idrissi Hassani L.M., Ould Ahmedou M.L., Chihrane J., Bouaïchi A., Effets d'une alimentation en *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) sur la survie et le développement ovarien du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* Forskål (Orthoptera, Acrididae). Ethnopharmacologia, 23 (1998) : 26-41.
- [12] Idrissi Hassani L.M., « Contribution à l'étude phytochimique du harmel *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) et étude de ses effets sur la reproduction et le développement du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* Forsk » Thèse Doctorat d'Etat. Université Ibn Zohr, Agadir, (2000) 214.
- [13] Le Gall P., Le choix des plantes nourricières et la spécialisation trophique chez les Acridoidea (Orthoptera). Bull. écol., 20 (1989) : 245-261. Disponible en ligne : [http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/pleins\\_textes/5/b\\_fdi\\_20-21/27498.pdf](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes/5/b_fdi_20-21/27498.pdf)
- [14] Hamadi K., Doumandji-Mitiche B., Étude de l'activité biologique d'extraits de plantes acridifuges sur *Aiolopus strepens* (Latreille, 1804) et influence de ces plantes sur la consommation et sur le taux de mortalité. IV<sup>ème</sup> journée d'acridologie, Dép. Zool. Agri. Forest., Inst. Nat. Agro., 04 mars 2002.
- [15] Raccaud – Schoeller J., Les insectes : physiologie, développement. Ed. Masson, Paris, (1980) 296.
- [16] Chauvin R., Anatomie et histologie du tube digestif de *Schistocerca gregaria*. Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord, 18 (1938) 488-499. Disponible en ligne : <https://studylibfr.com/doc/4878311/anatomie-et-histologie-du-tube-digestif-de-schistocerca-g...>
- [17] Grassé P.P., Traité de Zoologie. Tome VIII, Masson, Paris (1976).
- [18] Nasiruddin M., Mordue (Luntz) A.J., The effect of azadirachtin on the midgut histology of the locusts *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. Tissue and Cell, 25 (1993) : 875-884. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(93\)90036-K](https://doi.org/10.1016/0040-8166(93)90036-K)
- [19] Idrissi Hassani L.M., Hermas J., Effet de l'alimentation en *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) sur le tube digestif du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* Forsk. (Orthoptera, Acrididae). Zool. Baetica, 19 (2008) : 71-84. Disponible en ligne. [http://www.ugr.es/~zool\\_bae/vol19/Zoo-5.pdf](http://www.ugr.es/~zool_bae/vol19/Zoo-5.pdf)
- [20] Mordue A.J., Cottee P.K., Evans K.A., Azadirachtin: its effect on gut motility, growth and moulting in *Locusta*. Physiol. Ent., 10 (1985) : 431-437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1985.tb00064.x>
- [21] Bezaze G., Mouhouche F., Effet de l'extraction foliaire du Laurier rose (*Nerium oleander*) sur la mortalité et l'évolution pondérale du criquet migrateur (*Locusta migratoria*) (Acrididae, Oedipodinae), Séminaire International sur la Protection des Végétaux, Dép. Zool. Agr. Forest., Ecole Nat. Sup. Agro., El Harrach, du 18 au 21 avril 2011 El Harrach, (2011) 46.
- [22] Kemassi A., Hellal N., Hadj Mhammed M., Doual Z., Ould El Hadj-Khelil A., Ould El Hadj M.D., Bioactivité des huiles essentielles de *Cymbopogon schoenanthus* L. (Poaceae) sur les larves et les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera-Acrididae). Séminaire International sur la Protection des Végétaux, Dép. Zool. Agr. Forest., Ecole Nat. Sup. Agro., El Harrach, du 18 au 21 avril 2011, (2011) 144.
- [23] Bagari M., Bouhaimi A., Ghaout S., Chihrane J., The toxic effects of *Nerium oleander* on larvae of the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera, Acrididae). Zool. Baetica, 24 (2013) : 193-203. Disponible en ligne : [http://www.ugr.es/~zool\\_bae/vol24/Zoo-10-Thetoxic.pdf](http://www.ugr.es/~zool_bae/vol24/Zoo-10-Thetoxic.pdf)



## Annexe

Les différentes étapes du protocole expérimental suivi en pratique histologique sont détaillées dans le tableau ci-dessous :

Étapes	Composition	Mode opératoire	Nombre de bains	temps	Intérêt, résultat
Fixation : Bouin aqueux	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solution aqueuse d'eau distillée saturée d'acide picrique.....30 mL</li> <li>• Formol.....10 mL</li> <li>• Acide acétique cristallisable ..... 2 mL</li> </ul>	Immersion	1	3 à 8 jours	Le choix de « Bouin aqueux » est dû à la propriété de l'acide picrique à précipiter les protéines. Associés au Formol, la capacité de pénétration de l'acide picrique est augmentée.
Déshydratations des pièces après fixation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcool 70°</li> <li>• Alcool 95°</li> <li>• Alcool 100°</li> </ul>	Immersion	2 2 2	30 mn 30 mn 30 mn	Étape préliminaire avant le paraffinage. Les bains d'alcool à titre croissant afin d'éliminer l'eau des tissus à étudier, la paraffine n'étant pas miscible à l'eau.
Liquide d'attente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Butanol</li> </ul>	Immersion	1	Plusieurs jours	Parachèvement de la déshydratation
Imprégnation à la paraffine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Moitié butanol et moitié paraffine.</li> <li>• Paraffine pure.</li> <li>• Paraffine pure.</li> </ul>	Immersion	1 1 1	1 h 1 h 1 h	La paraffine est un mélange d'hydrocarbures saturés. L'intérêt est l'obtention d'une masse homogène par pénétration petit à petit dans les tissus en remplaçant les solvants.
Coulage des blocs et microtomisation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paraffine</li> </ul>	Verser la paraffine dans les barres de Leukart, placer l'organe selon le plan de coupe désirée à l'aide de pinces chauffées ; une étiquette de référence est placée à l'opposé de l'organe.	1	L'opération doit être rapide	Facile à couper au rasoir. Obtention des rubans de paraffine des rubans de paraffine contenant des coupes.
Étalement des coupes : eau gélatinée	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gélatine en poudre....0.4</li> <li>• Eau distillée... 100 mL</li> <li>• Thymol....1 graine</li> </ul>	0.4 gélatine en poudre + 100 mL eau distillée chaude. Refroidissement + 1 graine de thymol	Gouttes	Quelques minutes	Pour l'étalement des rubans de coupes sur des lames disposées sur une platine chauffante.
Réhydratations de paraffine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toluène</li> <li>• Alcool 100°</li> <li>• Alcool 95°</li> <li>• Alcool 70°</li> <li>• Eau distillée</li> </ul>	Immersion	2 2 2 1 1	30 min 30 min 30 min 30 min 5 min	Le toluène achève le déparaffinage. Les coupes sont hydratées

Étapes	Composition	Mode opératoire	Nombre de bains	temps	Intérêt, résultat
Coloration topographique et histochimique : Mallory	Solution de fuchsine acide : • Fuchsine acide .....1 g • Eau distillée.....100 mL	• Colorer à la solution de fuchsine acide. • Égoutter à l'eau distillée.	1	3 min	Noyau coloré en rouge sombre par fuchsine acide ; Cytoplasme en rouge par l'orange G ; Fibres de collagène en bleu intense grâce au bleu d'aniline et les muscle en bleu
	Mélange de Mallory : • Bleu d'alanine ..... 5 g • Orange G ..... 2 g • Acide phosphothungstique .....1 g • Eau distillée.....100 mL	• Colorer par Mallory. • Rincer à l'eau distillée. • Déshydrater par l'alcool absolu et monter au baume de canada.	1 1 1 1		
	Rouge nucléaire solide : • Préparation à chaude • Rouge nucléaire solide 0,1 g • Sulfate d'aluminium ..5 g • Eau distillée .....1000 mL • Porter à l'ébullition puis laisser refroidir et filtrer.	• Colorer au rouge nucléaire solide. • Rincer à l'eau distillée. • Traiter par l'acide phosphothungstique. • Laver à l'eau distillée.	1 1 1 1	5 min	
	Acide phosphothungstique : • Acide phosphothungstique.....5 g • Eau distillée.....100 mL	• Colorer par le bleu d'Heidenhain • Rincer à l'eau distillée	1 1		
Coloration topographique variante de l'Azan de Heidenhain	Bleu de Heidenheim : • Bleu d'aniline.....0.2 g • Orange G ..... 5 g • Eau distillée.....100 mL • Acide acétique ...1 mL.	• Déshydrater par l'alcool absolu et monter au baume de canada.	1 1	7 min	Noyaux ou certains cytoplasmes sont jaunes ou gris. Le collagène et les fibres réticulaires sont bleu foncé. Mucus en bleu. Les fibres musculaires en orange marron. Les graines de sécrétion sont bleues ou rouges selon leur nature. En générale mucopolysaccharides sont bleus.

Submitted on: 15/03/2021

Revised form accepted on: 14/06/2021

Corresponding author: [bassem.jaouadi@cbs.mrt.tn](mailto:bassem.jaouadi@cbs.mrt.tn)



Revue  
Nature et Technologie

<http://www.univ-chlef.dz/revuenatec>

ISSN : 1112-9778 – E-ISSN : 2437-0312

# Preliminary screening and characterization of novel proteolytic enzymes produced by extremophilic bacteria isolated from Tunisian and Algerian biotopes

Sondes MECHRI<sup>a</sup>, Khelifa BOUACEM<sup>b,c</sup>, Fawzi ALLALA<sup>b</sup>, Marwa KHALED<sup>a</sup>, Amel BOUANANE-DARENFED<sup>b</sup>, Hocine HACÈNE<sup>b</sup>, Bassem JAOUADI<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Microbial Biotechnology and Engineering Enzymes (LMBEE), Center of Biotechnology of Sfax (CBS), University of Sfax, Road of Sidi Mansour Km 6, P.O. Box 1177, Sfax 3018, Tunisia

<sup>b</sup> Laboratory of Cellular and Molecular Biology (LCMB), Microbiology Team, Faculty of Biological Sciences (FSB), University of Sciences and Technology Houari Boumediene (USTHB), P.O. Box 32, El Alia, Bab Ezzouar, 16111 Algiers, Algeria

<sup>c</sup> Department of Biochemistry & Microbiology, Faculty of Biological and Agricultural Sciences (FBAS), University Mouloud Mammeri of Tizi-Ouzou (UMMTO), P.O. Box 17, Tizi-Ouzou 15000, Algeria

## Abstract

The current paper reports on the production and characterization of extracellular thermostable proteases produced from thermophilic bacteria namely *Aeribacillus pallidus* VP3, *Anoxybacillus kamchatkensis* M1V, *Virgibacillus natechei* FarD<sup>T</sup>, and *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A<sup>T</sup> strains isolated from different extremophilic biotopes in Tunisia and Algeria. The key challenge of the use of the different proteases in industrial applications is their efficiency under unconventional conditions. An optimization via one-factor-at-a-time (OFAT) methodology has been used to obtain 3,000 U.mL<sup>-1</sup>; 4,600 U.mL<sup>-1</sup>; 15,800 U.mL<sup>-1</sup>; and 16,000 U.mL<sup>-1</sup> of proteases activity from VP3, M1V, FarD<sup>T</sup>, and Nari2A<sup>T</sup> strains, respectively. Particularly, VP3 and FarD<sup>T</sup> proteases showed a high tolerance to several organic solvents. In addition, the protease produced from FarD<sup>T</sup> strain might be useful as potential candidate for application in detergency. The deproteinization of shrimp wastes by M1V and Nari2A<sup>T</sup> proteases was successful with a high rate of deproteinization of about 48% and 82%. The obtained proteolytic hydrolysate obtained by M1V strain showed high biological activities with half maximal inhibitory concentration (IC50) of 71.52 µg.mL<sup>-1</sup>, 107.67 µg.mL<sup>-1</sup>, and 133.24 µg.mL<sup>-1</sup>, respectively for the angiotensin, tyrosinase, and amylase inhibitory activities.

Keywords: Extremophilic bacteria; Thermostable proteases; Biotechnologically applications.

## 1. Introduction

Microbial life does not seem to be restricted to specific environments. Over the past few decades, it has become clear that microbial communities can be found in the most diverse conditions, including extremes of pressure, salinity, temperature, and pH [1]. These microorganisms, called extremophiles, produce biocatalysts mainly enzymes that are functional under extreme conditions. Accordingly, the unique properties of these biocatalysts have resulted in several novel applications of enzymes in industrial and biotechnological processes.

Biochemical properties of these enzymes demonstrated that they have a high optimum working

temperature and pH, which could make them suitable for industries applications [2, 3]. Above all, proteases are enzymes catalyses the hydrolysis of peptide and iso-peptide bonds that join amino acids within proteins. Again, they can act near the ends of polypeptide chains [4]. They are differentiated according to their substrate specificity as amino-peptidases, which are cleaves the peptides at the N-terminus, and carboxypeptidases, which are degrades peptides at the C-terminus [5]. The unique catalytic activities of these enzymes make them an inexpensive choice for hydrolyzing peptide bonds for industrial uses [6].

Their ability to break down these compounds makes them excellent for stain removal. Proteolytic enzymes catalyze the hydrolysis of proteinaceous material and



This is an open-access document under the terms of the Creative Commons Attribution License CC-BY, which allows it to be shared, copied, reproduced, distributed, communicated, reused or adapted with the obligation to credit its author

show the highest abundance amongst industrial relevant biocatalysts [7, 8]. Proteolytic enzymes are found to have a large multiplicity in their applications, such as constituent in detergents [9], industrial processing of food [10], leather [11], peptide synthesis [12], and pharmaceutical products [13]. Additionally, the use of these proteases is highly efficient, by allowing the recovery of chitin and bioactive peptides from crustacean's bio-wastes [14, 15]. This was supported by cloning amino-acid sequences inspection and homology-modeling of the genes encoding extremozymes, which is endowed with a number of characteristics that are highly valued. Thus, these observations inspired us to explore other enzymes from the extremophile strains.

For particular interest, North Africa countries by their geographical position present a great diversity of extreme biotopes occupied by an important microbiological richness. Mainly, Tunisia and Algeria possess many extreme biotopes such as saline lakes, hydrothermal hot springs, and petroleum reservoirs. Furthermore, the family of *Bacillaceae* comprises the rod-shaped bacteria which form endospores, having a wide diversity of physiological characteristics. Their ability to form hardy spores enables them to be widely distributed in nature, from Arctic environments to hot springs and desert sands and from fresh water to salt or marine sediments. Very few reports are available on enzymes production from *Aeribacillus*, *Anoxybacillus*, *Virgibacillus*, and *Melghiribacillus* genera.

Keeping these points in view, the present contribution was undertaken the screening of bacteria isolated from different extreme ecological niches in Tunisian and Algeria and hyperproducing of proteolytic enzymes.

Additionally, the optimization through one-factor-at-a-time (OFAT) methodology and biotechnological application of these proteases, having expected proprieties for their potential uses as bio-additives with various laundry detergents and deproteinization of crustacean's by-products are also investigated.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Microorganisms

Different strains were isolated from different extreme ecological niches in Tunisia and Algeria

(Figure 1). The biotopes are saline lakes, hydrothermal hot springs, and petroleum reservoirs. The ATAM, M1V, B5GN, HB14, and BA1 strains were isolated from Hammam Righa hot spring Ain Defla, in northwestern Algeria [16]. The heating system is characterized with a temperature of 68°C, a salinity of 150 g.L<sup>-1</sup> and a pH of 6.9. The VP3 strain is isolated from the production water of the Litayem oil-field managed by Thyna Petroleum Services<sup>1</sup>, Sfax, Tunisia. The formation water was withdrawn from the oil-bearing horizons from depths of 1,300 m, with a temperature of 78°C, a salinity of 100 g.L<sup>-1</sup>, and a pH 7.6, after passing through a pipeline of about 20 km. The FarD<sup>T</sup> strain is isolated from sediments of a saline lake located in Taghit, 93 km from Bechar, southwest of Algeria. The temperature at the sampling site was 39°C and pH was 6.8. The Nari2A<sup>T</sup> strain is isolated from the soil of Chott Melghir, an Algerian Salt Lake located at north-east of Biskra city, Algeria. The temperature at the sampling site was 39°C and the pH was 6.8. The soil is characterized by alkaline pH of 8.4 and a salinity of 112 g.L<sup>-1</sup>. The C2SS100 and C2SS10 strains are isolated from the production water of Sercina petroleum reservoir, located near the Kerkennah Island, Tunisia. The production water is of about 30 km with a temperature of 25°C, a salinity of 71 g.L<sup>-1</sup>, and a pH of 7.8. The positive strains were screened on skimmed milk agar plates (SMAP) as earlier reported [17].

### 2.2. Identification of microorganisms, DNA sequencing, and phylogenetic analysis

The VP3, M1V, FarD<sup>T</sup>, and Nari2A<sup>T</sup> strains were identified previously based on both catabolic and molecular approaches [18-21]. For example, the species level identification of strain M1V was performed using microbiological characteristics and 16S rRNA (rDNA) gene sequence analysis. The colony morphologies were determined using cultures grown aerobically on nutrient agar (NA). Cell morphology and motility were examined microscopically in exponentially growing liquid cultures after 18 to 24 h of incubation at 60°C by means of conventional tests. Acid production from carbohydrates and hydrolyses of some polymers were determined using analytical profile index (API) strip tests API 20E and API 50 CHB (bioMérieux, SA,

<sup>1</sup> <http://www.made-in-tunisia.net/vitrine/contact.php?tc1=IKmYnqyS>

Marcy-1'Etoile, France) as recommended by the manufacturer. The temperature range for growth was determined by incubating the isolate at 30 to 80°C. The effect of NaCl on bacterial growth was studied in the presence of 1 to 5% (w/v) NaCl. The pH dependence of growth was tested in the pH range of 6 to 10. All the physiological tests were determined in NA medium, with the exception of the temperature growth at 80°C which was performed in Nutrient broth (NB). The polymerase chain reaction (PCR) amplification of the 16S rRNA gene was carried out with two universal primers, one forward and the other reverse, designed from the conserved zones within the rRNA operon of *E. coli* [22]. The forward primer was 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' extended from base position 8 to 27; the reverse primer was 5'-AAGGAGGTGATCCAAGCC -3' extended from base position 1541 to 1525. The genomic DNA of the M1V strain was purified using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) and then used as a template for PCR amplification. After denaturation at 95°C for 5 min, DNA samples were subjected to 35 cycles of amplification with denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 61°C for 45 s, and extension at 72°C for 60 s, followed by a final elongation step at 72°C for 10 min. The PCR product (~1.5 kb) was then cloned in the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA), leading to the pM1V-16S plasmid. The *E. coli* DH5 $\alpha$  was used as a host strain. All recombinant clones of *E. coli* were grown in Luria-Bertani (LB) media composed of (g.L<sup>-1</sup>) the following: peptone, 10; yeast extract, 5; NaCl, 5 at pH 7.4, with the addition of ampicillin (100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), isopropyl-thio- $\beta$ -d-galactopyranoside (IPTG) (0.67 mM), and X-gal (360  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) for screening. DNA electrophoresis, DNA purification, restriction, ligation, and transformation were all performed according to the Sambrook method previously described [23].

### 2.3. Media composition and culture conditions

Enzyme production by microorganisms is generally affected by growth conditions and culture medium composition. Every strain has a particular optimized medium at pH 7.4.

The preculture of M1V and VP3 strains was carried out in a 1 L Erlenmeyer flask containing 100 mL of LB liquid medium at pH 7.4, then incubated at 45°C overnight. While, the preculture of FarD<sup>T</sup> strain was carried out on Sehgal and Gibbons medium (SG) containing the following (in g.L<sup>-1</sup>): casamino acids, 7.5; yeast extract, 10; sodium glutamate, 1; trisodium citrate, 3; MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 20; KCl, 2; FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0.036; and MnCl<sub>2</sub>·4 H<sub>2</sub>O, 0.00036 supplemented with 100 g.L<sup>-1</sup> of NaCl at pH 7 then incubated at 35°C overnight.

For Nari2A<sup>T</sup> strain, the preculture was carried out on International Streptomyces Project 2 medium (ISP2) containing the following (in g.L<sup>-1</sup>): glucose, 4; yeast extract, 4; malt extract, 4; CaCO<sub>3</sub>, 2; and 10% (w/v) NaCl then incubated at 55°C overnight. These preculture were used to inoculate different cultures, with initial A600 nm of 0.1 on optimized media for 22 h at 45°C (for VP3 strain), for 48 h at 45°C (for M1V strain), for 36 h at 35°C (for FarD<sup>T</sup>), and for 52 h at 55°C (Nari2A<sup>T</sup> strain). The protease from *Aeribacillus pallidus* strain VP3 was produced using the optimized medium composed of (g.L<sup>-1</sup>): gelatin, 15; soya flour, 2; NaCl, 10; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1; and 1% (v/v) trace elements. The alkaline protease from M1V strain was produced using the medium composed of (g.L<sup>-1</sup>): gruel, 8; soy peptone, 4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1, CaCl<sub>2</sub>, 0.2; MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0.1 and 1% trace elements. The trace elements composed of (g.L<sup>-1</sup>) the following: ZnCl<sub>2</sub>, 0.4; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.065; and MoNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.135. The media were autoclaved at 120°C for 20 min. The proteases from *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A<sup>T</sup> and *Virgibacillus natechei* FarD<sup>T</sup> strains were produced using the optimized media containing only 40 and 60 g.L<sup>-1</sup> white shrimp shell by-product in the Erlenmeyer flasks. Before each assay, the cell debris was removed by centrifugation at 10,000 g for 30 min. Next, the obtained clear supernatant was used as a crude enzyme preparation.

### 2.4. Protease activity assay

The protease activity was assayed by the addition of 0.5 mL of an appropriately diluted enzyme in 100 mM of the appropriate buffer, supplemented with 2 mM CaCl<sub>2</sub>, to a 0.5 mL of 10 g.L<sup>-1</sup> casein. The reaction mixture was incubated for 15 min at the appropriate



temperature. The reaction was stopped by adding 0.5 mL of 200 g.L<sup>-1</sup> TCA. In fact, the liberated tyrosine from casein was measured using Kumbhani method [24]. One unit (U) of peptidase was defined as the amount of enzyme releasing 1 µg of tyrosine released under the assay conditions detailed. Protease activity present in the laundry detergent solution was determined through the method proposed by Boukour

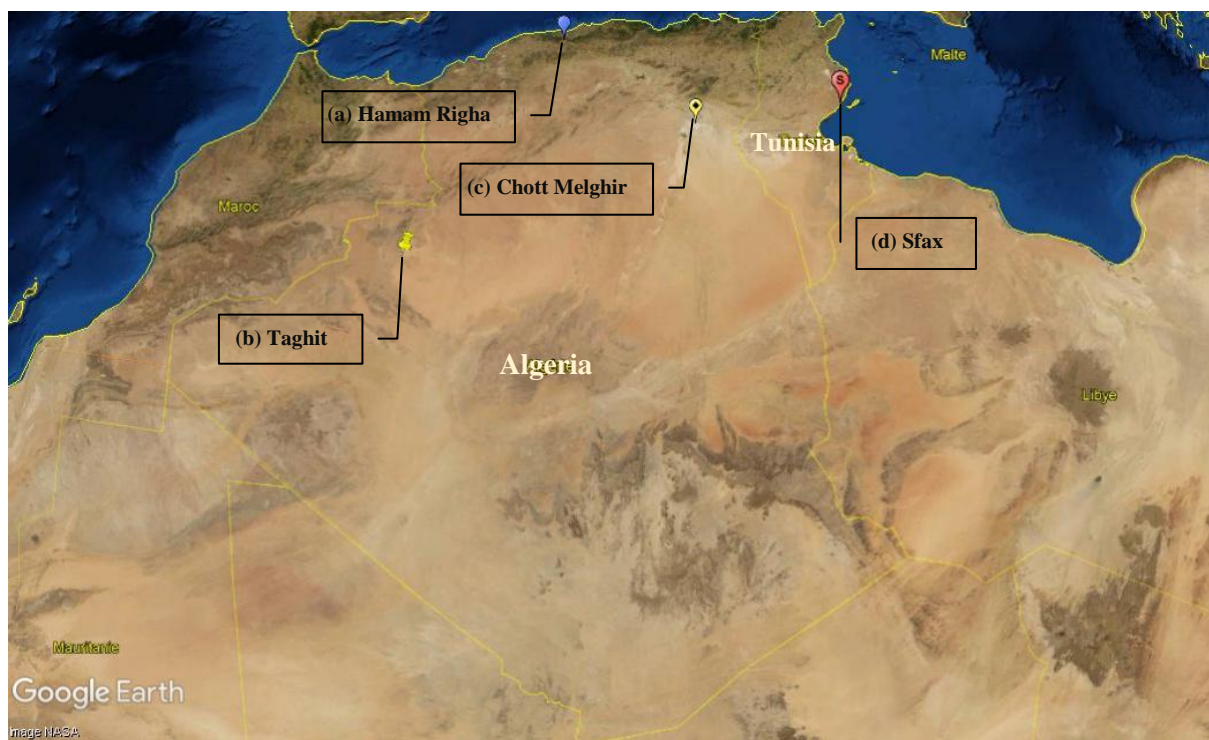
Touioui et al. [25], which used the *N,N*-dimethylated casein (DMC) as a substrate and 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBSA) as a color indicator. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to catalyze the cleavage of 1 µmole of peptide bond from DMC per minute under the experimental conditions used. The absorbance was measured at 450 nm.

**Extremophilic bacteria isolated from Tunisian and Algerian biotopes**

(a) Strain isolated from Algerian hydrothermal hot spring

(b), (c) Strains isolated from Algerian saline lake

(d) Strain isolated from Tunisian petroleum reservoir



(a)  
↓  
Strain M1V



(b)  
↓  
Strain FarD<sup>T</sup>



(c)  
↓  
Strain Nari 2A<sup>T</sup>



(d)  
↓  
Strain VP3

Figure 1: Geographical localization of the sites used for screening extremophilic bacteria in Algeria and Tunisia





## 2.5. Performance evaluation of the different proteases

### 2.5.1. Effects of organic-solvents on proteases activity and stability

Various organic solvents such as cyclohexane, chloroform, 1-butanol, ethyl acetate, *iso*-propanol, ethanol, methanol, and dimethyl sulfoxide (DMSO), with different Log *P* values at 50% (v/v), were tested by shaking at 190 strokes per min and 37°C for 3 days to evaluate their effects on protease activity and stability, respectively. The relative and residual caseinolytic activities were assayed under the same conditions. The activity of each enzyme without any organic solvent was taken as 100%.

### 2.5.2. Stability and compatibility of proteases with laundry detergents

The stability and compatibility of a variety of proteases with a wide range of commercial solid and liquid commercialized detergents were investigated. In order to check their stability and compatibility with detergents, each commercial detergent was diluted in tap water to obtain a final concentration of 7 mg.mL<sup>-1</sup> (in order to simulate washing conditions). The endogenous proteolytic enzymes present in these laundry detergents were inactivated by heating the diluted detergents for 1 h at 65°C, prior to the addition of each enzyme. A 500 U.mL<sup>-1</sup> of each protease was shake-incubated with each laundry detergent for 1 h at 40°C, and residual protease activity was determined at pH 10 and 60°C using DMC as a substrate. The enzyme activity of a control (without any detergent), incubated under similar conditions, was taken as 100%.

To estimate the stain removal capabilities of FarD<sup>T</sup> enzyme, Alcalase 2.4L FG, and Bioprotease N100L proteases, clean white cotton cloth pieces (5 cm × 5 cm) were soaked and dried with chocolate, egg, and blood. The stained cloth pieces were shake-incubated separately for 1 h with 1 L beakers containing a total volume of 100 mL of tap water, Class detergent (7 g.L<sup>-1</sup>, in tap water), and detergent added with 500 U.mL<sup>-1</sup> of FarD<sup>T</sup> enzyme or with 500 U.mL<sup>-1</sup> of commercial proteases (Bioprotease N100L or Alcalase 2.4 L FG), followed by rinsing with water. Then, the

washed cloth pieces were dried. Visual examination of various pieces was also carried out to show the effect of each used enzyme in the removal of proteinaceous stains. Then, untreated stained piece of cloth was taken as a control.

### 2.5.3. Deproteinization of crustacean's bio-wastes

For the production of protease, the M1V strain was cultured in a 1 L Erlenmeyer flask with a working volume of 50 mL, containing 25 g.L<sup>-1</sup> shrimp waste at pH 7.4 for 48 h at 45°C in rotary shaker (200 rpm). Before each activity assay, the biomass was taken away by centrifugation at 10,000×g for 30 min, and the supernatant was used for the evaluation of protease activity and chitin extraction. Furthermore, the cleared supernatant was filtered through a coarse cloth followed by the use of a sieve (22 mesh size). Subsequently, the resulting filtrate (hydrolysate) was concentrated in a rotary evaporator at 40°C, freeze dried, and stored at -20°C. Next, the composition of the lyophilized hydrolysate and its biological activities were evaluated. The proteases efficiency in the deproteinization of shrimp, *Metapenaeus monoceros* shells by-products was conducted using different enzyme/substrate [E/S] [unit of enzyme/milligram protein] ratios ranging from 0 to 30. A 2 g of the shell homogenate was mixed with 50 mL distilled water at 75°C. The pH was adjusted to 10 with 5 N NaOH. The reactions were stopped by heating the solutions at 90°C for 24 h to inactivate the proteases activity. The solid phase was washed and then pressed manually through four layers of gauze [26]. The degree of deproteinization (DDP %) was calculated as described elsewhere [27].

## 2.6. Bioinformatics tools, DNA sequencing, and DNA sequence analyses

Phylogenetic and molecular evolutionary genetic analyses of ARNr 16S genes sequences of VP3, M1V, FarD<sup>T</sup>, and Nari2A<sup>T</sup> strains were performed using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis<sup>2</sup> (MEGA) software v. 4.1. Distances and clustering were calculated using the neighbor-joining method. The tree

<sup>2</sup> <https://www.megasoftware.net>

topology of the neighbor-joining data was evaluated by Bootstrap analysis with 100 re-samplings.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Screening of protease-producing bacteria

In the current study, ten aerobic bacterial strains (*Aeribacillus pallidus* VP3, *Halomonas lutea* C2SS100Ciq, *Bacillus thermoamylovorans* ATAM, *Anoxybacillus kamchatkensis* M1V, *Lysinibacillus fusiformis* C250R, *Hydrogenophilus hirshii* B5GN, *Albidovulum inexpectatum* HB14, *Geobacillus thermodenitrificans* BA1, *Virgibacillus natechei* FarD<sup>T</sup>, and *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A<sup>T</sup> strains) were studied. Among the ten strains, the VP3, M1V, FarD<sup>T</sup>, and Nari2A<sup>T</sup> strains were identified as protease hyper-producers based on their patterns of clear zone formation on casein-containing media at pH 7.4. On a basal media, the strains VP3, M1V, FarD<sup>T</sup>, and Nari2A<sup>T</sup> displayed 1,400; 3,000; 7,500, and 4,300 U.mL<sup>-1</sup>, respectively (Table 1).

#### 3.2. Taxonomy identification and molecular phylogeny of the microorganisms

The taxonomic position of the four selected strains was established by phenotypic characteristic and using 16S rRNA gene sequencing (Figure 2). VP3, M1V, FarD<sup>T</sup>, and Nari2A<sup>T</sup> were identified as related genera of *Bacillus*.

The VP3 cells were motile rods, Gram-positive and spore forming. Catalase and oxidase reactions were positive. The temperature range for growth was 37°C to 65°C, with an optimum at 55°C. The salt concentration range for growth was between 0 g.L<sup>-1</sup> and 80 g.L<sup>-1</sup> NaCl, with an optimum at 10 g.L<sup>-1</sup> NaCl [18]. Phylogenetic analysis revealed that strain VP3 was a member of *Firmicutes* phylum, family of *Bacillaceae* and was most closely associated to members of the genus *Aeribacillus* and in particular to the species *Aeribacillus pallidus*, with an average similarity of 99% (GenBank accession no.: KC581418).

For the M1V strain, cells were arranged singly or in pair, sporulated, motile, and rod-shaped bacterium. The isolate M1V was identified as a Gram-positive, aero-anaerobic facultative, catalase-positive, and oxidase-positive. The strain M1V was nitrate reduction positive and show negative results regarding tryptophane desaminase, lysine decarboxylase, H<sub>2</sub>S, citrate, β-galactosidase, urease, indol, ornithine decarboxylases, and arginine dihydrolase production. The API 20E profile revealed that the M1V isolate could utilize gelatine. The API 50 CH tests revealed that it could utilize arabinose, inositol, and saccharose. Moreover, the strain M1V grew up to 80 °C with a pH range for growth between 7 and 9 and was able to grow in a range of 1% to 4% NaCl, suggesting its alkali-tolerance.

The 16S rRNA gene sequence from M1V was determined (GenBank accession no.: MH973636) and was 98% similar to that of *Anoxybacillus kamchatkensis* JW/VK-KG4T (GenBank accession no.: AF510985)

According to the phenotypic, morphologic, and molecular analysis, strain FarD<sup>T</sup> is considered to represent a novel species of the genus *Virgibacillus* in the family *Bacillaceae* and order *Bacillales*, for which the name *Virgibacillus natechei* sp. nov., is proposed. The type strain of *Virgibacillus natechei* is FarD<sup>T</sup> (DSM 25609<sup>T</sup> or CCUG 62224<sup>T</sup>) [20]. The FarD<sup>T</sup> cells were rod-shaped, endospore forming, and motile. Growth occurred at 15°C to 40°C (optimum, 35°C), pH 6 to 12 (optimum, 7) and in the presence of 1% to 20% NaCl (optimum, 10 %).

While, the *Melghiribacillus thermohalophilus* strain Nari2A<sup>T</sup> gen. nov., sp. nov., is a novel filamentous, endospore-forming, thermophilic and moderately halophilic bacterium [21]. The type strain Nari2A<sup>T</sup> was Gram-positive, aerobic, catalase-negative and oxidase positive. Optimum growth occurred at 50 to 55°C, 7 to 10 % (w/v) NaCl, and pH 7 to 8. The strain exhibited 95.4%, 95.4%, and 95.2% 16S rRNA gene sequence (GenBank accession no.: KC845574) similarity to *Thalassobacillus devorans* strain G19.1<sup>T</sup>, *Sediminibacillus halophilus* strain EN8d<sup>T</sup>, and *Virgibacillus kekensis* strain YIM-kkny16<sup>T</sup>, respectively.

Table 1  
Retained proteolytic bacteria, their origins and initial protease activity.

Microorganism	Origin	Initial protease activity (U.mL <sup>-1</sup> )	Optimized protease activity (U.mL <sup>-1</sup> )
<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> strain M1V	Hammam Righa hot spring Ain Defla, Algeria	3,000	4,600
<i>Aeribacillus pallidus</i> strain VP3	Thyna Petroleum Services, Sfax, Tunisia	1,400	3,000
<i>Melghiribacillus thermohalophilus</i> strain sp. nov., gen. nov., Nari2A <sup>T</sup>	Sahara salt lake, Chott Melghir, Algeria	4,300	15,800
<i>Virgibacillus natechei</i> strain sp. nov., FarD <sup>T</sup>	Sediments of a saline lake, Taghit, Bechar, Algeria	7,500	16,000

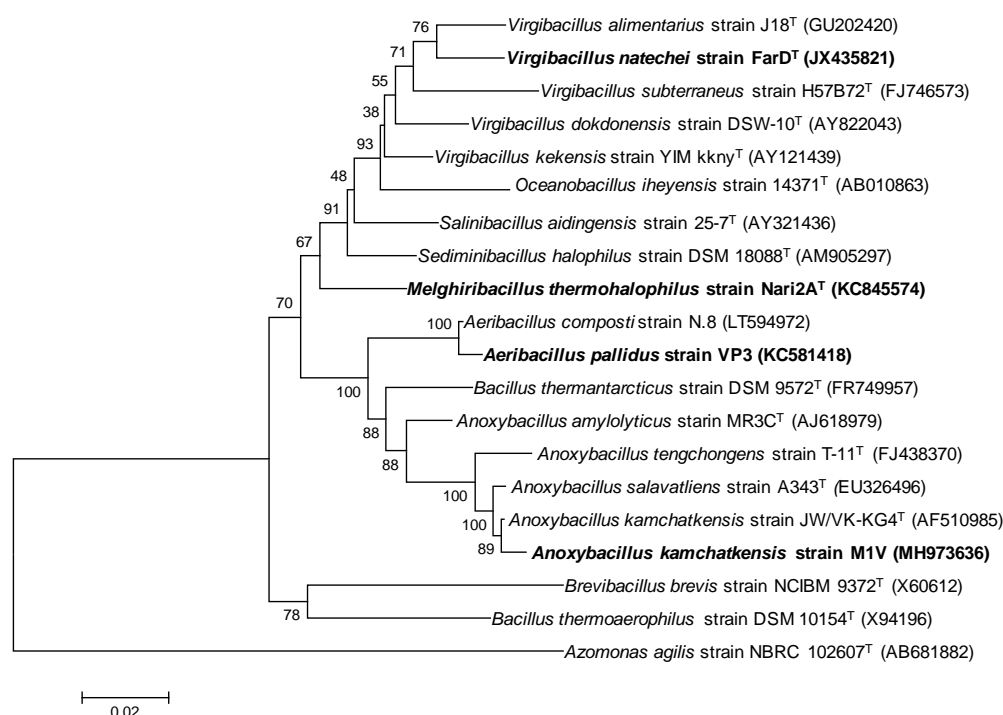


Figure 2: Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of VP3, M1V, FarD<sup>T</sup>, and Nari2A<sup>T</sup> strains within the radiation of the other bacterial genus. The sequence of *Azomonas agilis* strain NBRC 102607<sup>T</sup> (accession no: AB61882) was chosen arbitrarily as an outgroup. Bar, 0.02 nt substitutions per base. Numbers at nodes (>50%) indicate support for the internal branches within the tree obtained by bootstrap analysis (percentages of 100 bootstraps). NCBI accession numbers are presented in parentheses.

### 3.3. Optimization via OFAT methodology

A classical method OFAT, which involves changing one independent variable, while fixing others at certain levels, was adopted to optimize the proteases production by VP3, M1V, FarD<sup>T</sup>, and Nari2A<sup>T</sup> strains.

OFAT optimization strategy of the medium involves changing one independent variable, such as carbon and azote sources, temperature, and pH, while fixing others at certain levels. Some researchers have shown that OFAT method can be more effective under certain conditions since, the number of runs is limited,

and experimental error is not large compared to factor effects, which must be additive and independent of each other. Currently, the optimization of protease production from VP3, M1V, FarD<sup>T</sup>, and Nari2A<sup>T</sup> strains is currently underway through design of experiments approaches (DOE, DOX, or experimental design) by the means of Taguchi, Box-Behnken, and Plackett-Burman designs.

For example, for the *Aeribacillus pallidus* strain VP3, the best carbon source and nitrogen sources were chosen. Various carbon sources at a concentration of 5 g.L<sup>-1</sup> (casein, gelatin, glucose, sucrose, xylose, and

maltose) were tested. A best activity was achieved of 1,400 U.mL<sup>-1</sup> within gelatin. Then, the gelatin concentration was optimized by varying the concentration from 0 g.L<sup>-1</sup> to 25 g.L<sup>-1</sup>. So, an activity of 2,795 U.mL<sup>-1</sup> has been achieved at 15 g.L<sup>-1</sup> gelatin. Different organic and inorganic nitrogen sources at a concentration of 2 g.L<sup>-1</sup> (yeast extract, soya flour, meat extract, beef extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>FeSO<sub>3</sub>) were tested.

A best activity of 2,920 U.mL<sup>-1</sup> was recorded with soya flour. After that, the soya flour concentration was optimized by varying the concentration from 0 g.L<sup>-1</sup> to 6 g.L<sup>-1</sup>. Hence, an activity of 3,000 U.mL<sup>-1</sup> has been achieved at 2 g.L<sup>-1</sup> soya flour. So, the strain VP3 displayed the highest extracellular protease activity (~ 3,000 U.mL<sup>-1</sup>) after 22 h incubation in an optimized medium composed of g.L<sup>-1</sup> by gelatin, 15; soya flour, 2; NaCl, 10; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1; and 1% (v/v) trace elements.

For the M1V strain a maximum protease activity of 4,600 U.mL<sup>-1</sup> was achieved at pH 7.4 using the medium composed of (g.L<sup>-1</sup>): gruel, 8; soy peptone, 4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1, CaCl<sub>2</sub>, 0.2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 and 1% trace elements. The cultivation was performed for 48 h at 45°C. While, the strain Nari2A<sup>T</sup> was cultured in Erlenmeyer in an initial medium, containing 20 g.L<sup>-1</sup> of powder bio-waste from shrimp or crab for 52 h at 55°C. Powder from shrimp by-product as the sole energy, carbon, and nitrogen sources gave an acceptable level of proteases production, with (7,500 U.mL<sup>-1</sup>) followed by the powder from crab by-product with (3,200 U.mL<sup>-1</sup>).

Therefore, the effect of various concentrations of powder from white shrimp bio-waste on protease production by strain Nari2A<sup>T</sup> was studied. The optimum for the production of protease activity (15,800 U.mL<sup>-1</sup>) was obtained with 40 g.L<sup>-1</sup> of shrimp by-product. The strain FarD<sup>T</sup> was cultured for 36 h at 35°C in Erlenmeyer flasks in optimized media. A high level of peptidase production, (16,000 U.mL<sup>-1</sup>) was obtained with this bio waste as the sole carbon, and nitrogen sources.

### 3.4. Performance evaluation of the different proteases

#### 3.4.1. Effects of organic-solvents on protease activity and stability

The effects of organic solvents on the activity and stability of the protease's activities from VP3 and FarD<sup>T</sup> strains are shown in table 2. These enzymes exhibit high proteases activities in the presence of organic solvents. So, they would be very useful for organic synthetic reactions [9].

In upgrading to environmentally mild chemical synthesis, proteases are foreseen as superior enzymes as proteases in non-aqueous media offers various novel characteristics compare to traditional aqueous enzymatic transformation [28, 29]. The proteolytic enzymes have attracted a high deal of attention in organic synthesis because they have many advantages associated with the application of enzymes for the synthesis of peptides and esters [30-32]. Very few research works are published in literature concerning the screening of microorganisms which produce organic solvent-stable proteases [33]. Poor stability and low catalytic activity of enzymes are the major limitations of their use in organic solvents, which tend to strip water from protein and thereby disrupt non-covalent forces and decrease enzyme activity and stability.

The ability to use enzymes in non-aqueous solvents expands the potential applications of biocatalysts in chemical transformations which is useful for many industries. Enzymatic reactions in organic solvents provide numerous industrially attractive advantages, such as increased solubility of non-polar substrates, reversal of the thermodynamic equilibrium of hydrolysis reactions, suppression of water-dependent side reactions, alternation of substrate specificity and enantio-selectivity, and elimination of microbial contamination.

---



Table 2  
Effects of organic-solvents on protease activity and stability.

Organic solvents (50% v/v)	Relative activity (%)			Residual activity (%)		
	Crude extract from strain VP3	Crude extract from strain FarD <sup>T</sup>	Thermolysin	Crude extract from strain VP3	Crude extract from strain FarD <sup>T</sup>	Thermolysin
Control	100 ± 2.5	100 ± 2.5	100 ± 2.5	100 ± 2.5	100 ± 2.5	100 ± 2.5
Cyclohexan	304 ± 7.6	320 ± 8.02	138 ± 3.4	421 ± 10.5	280 ± 1.6	125 ± 3.5
Chloroform	196 ± 4.9	174 ± 6.4	93 ± 2.3	141 ± 3.5	126 ± 1.4	66 ± 1.9
1-butanol	162 ± 4.0	120 ± 2	43 ± 1.2	135 ± 3.6	81 ± 1.25	15 ± 1.0
Ethyl acetate	180 ± 4.5	74 ± 3	0 ± 0.0	164 ± 3.6	65 ± 0.3	0 ± 0.0
Iso-propanol	86 ± 2.1	90 ± 1.2	101 ± 2.5	67 ± 1.6	52 ± 0.2	91 ± 2.3
Ethanol	0 ± 0,0	40 ± 1,5	71 ± 2.0	0 ± 0,0	20 ± 0.2	35 ± 1.2
Methanol	163 ± 4,0	120 ± 2.7	92 ± 2.4	126 ± 3.1	84 ± 1.9	75 ± 2.0
DMSO	481 ± 12	180 ± 3.2	155 ± 4.1	370 ± 1.8	121 ± 3.2	27 ± 3.5

#### 3.4.2. Stability and compatibility of proteases with laundry detergents

The data presented in table 3 show that different proteases are stable and compatible with different detergents even after 1 h incubation at 40°C. It exhibited better stability with Class. Again, the addition of FarD<sup>T</sup> enzyme or commercial proteases (Alcalase<sup>TM</sup> Ultra 2.5 or savinase<sup>TM</sup> 16L, type EX L) in Class seems to improve the cleaning process as evidenced by rapid stain removal. In fact, protein stains like chocolate, egg, and blood have been hard to eradicate with commercial detergent. Some stains could only be dealt with at high temperatures and even then, the stain was only partly removed. Detergent enzymes particularly with proteases offered a key and are being persistently improved to digest proteinaceous stains.

The ability of proteases to hydrolyze the various proteinaceous stains has attracted the interest of industrialists in detergent market. The visual comparison of the washed cloth revealed that the combinations of every enzyme individually with

commercial detergents (Class) yielded fairly good results of its ability to remove blood, egg, and chocolate stains. In fact, a limited washing performance was observed with tap water only or with detergent (Class) only.

The supplementation of FarD<sup>T</sup> enzyme or commercial proteases (Bioprotease N100L or Alcalase 2.4 L FG) in Class detergent seems to enhance the cleaning process as evidenced by rapid stain removal. Thus, FarD<sup>T</sup> enzyme was characterized by its strong hydrolytic effect against blood and chocolate which are recalcitrant stains. Similarly, protease from strain VITP14 demonstrated its potential use as a bio-additive detergent in the removing of the blood stains from cotton cloth [34].

Although reported the usefulness of thermostable alkaline peptidase from *Bacillus* and related genus for the removal of protein stains from cotton cloth in the presence and absence of detergents [9, 35, 36], we believe that the FarD<sup>T</sup> enzyme form is more effective.

Table 3  
Stability and compatibility of proteases with laundry detergents

Commercial Detergents	Residual activity (%)				
	Bioprotease NL100	Alcalase 2.4 L FG	VP3 enzyme	M1V enzyme	FarD <sup>T</sup> enzyme
EcoVax	60	75	100	81	65
Dipex	62	90	100	97	92
Det	70	88	65	92	83
Ariel	85	90	81	71	71
Nadhif	82	85	100	100	90
OMO	83	100	92	52	65
Dixan	60	90	100	71	81
Skip	71	75	100	83	80
Class	86	80	53	52	100
iSiS	60	74	27	80	74
Dipex	62	90	51	86	92
Alyss	74	64	100	52	60
Detech	67	81	100	73	40
Judy	51	73	60	45	27

### 3.4.3. Deproteinization of crustacean's bio-wastes

Powder from shrimp and crab bio-wastes at 20 g.L<sup>-1</sup> gave an acceptable level of proteases production with 7,500 U.mL<sup>-1</sup> and 3,200 U.mL<sup>-1</sup>, respectively by the strain *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A<sup>T</sup>. Particularly, the *Anoxybacillus kamchatkensis* strain M1V was found to produce a high level of proteolytic activity when grown in a media containing shrimp bio-waste powder as a sole carbon and nitrogen source. In order to ameliorate proteases production by strain M1V, several concentrations of speckled shrimp by-product powder were applied. Since the protease activity was considerably detected and measured in the initial medium containing only 10 g.L<sup>-1</sup> of shrimp by-product, with a significant yield (1,200 U.mL<sup>-1</sup>), the investigation of medium by the classical method (OFAT) involves changing one independent variable (such as the agitation, temperature, and pH) while

fixing others at certain levels. The protease production increased linearly up to 25 g.L<sup>-1</sup> shrimp byproduct where it reaches its maximum (2,000 U.mL<sup>-1</sup>) (Table 4).

Beyond this concentration, the proteolytic activity decreased sharply by losing more than 25% of its maximum between 30 and 40 g.L<sup>-1</sup> shrimp substrate. Obviously, these results demonstrate that *Anoxybacillus kamchatkensis* strain M1V obtains its carbon, nitrogen, and salts supplies immediately from shrimp by-product. The protease production by strain M1V was undertaken in the optimal medium. The extent of protein hydrolysis during fermentation by *Anoxybacillus kamchatkensis* strain M1V was measured by assessing the proteolytic activity and hydrolysate composition. The hydrolysate has a maximum amount of protein (42 ± 1.02%), which coincides with the optimum of proteolytic production (2,000 U.mL<sup>-1</sup>) after 48 h of culture. The sugar level in the hydrolysate was about 2.5 ± 0.12% of sugar and a very low amount of fats (2 ± 0.06%).

Table 4  
Optimization of protease activity by M1V strain

Shrimp by-product concentration (g.L <sup>-1</sup> )	10	15	20	25	30	35	40
Protease activity (U.mL <sup>-1</sup> )	1,200	1,600	1,850	<b>2,000</b>	1,400	1,150	1,000
Biomass (g.mL <sup>-1</sup> )	1,8	3	6,07	<b>7</b>	5	5,04	3
Yield (protease/g bio-waste)	120	106,66	37	<b>80</b>	46,66	32,85	25

The obtained hydrolysate was noticeable due to its high protein content. Several studies have apprised that the controlled enzymatic digestion is the broadly applied method for the production of protein hydrolysates [37]. Within the time course of hydrolysis, a large variety of peptides and free amino-acids are generated depending on the protease specificity. Definitely, the level, the changes in size, and the composition of peptides and free amino-acids modulate the biological activities. Here, a few investigations have been conducted on the generation of biologically active proteins using microbial fermentation. In fact, the high protease activity ( $2,000 \text{ U.mL}^{-1}$ ) reflects the generation of small sized bioactive peptides in the hydrolysate mixture. Indeed, the hydrolysate was assessed for its antioxidant and enzyme inhibitory capacities using various tests. In the present investigation, a stronger

angiotensin inhibitory activity (ACEI) was recorded for shrimp shell hydrolysate compared to captopril activity. The corresponding half maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) was  $71.52 \pm 1.48 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $85.33 \pm 1.26 \mu\text{g.mL}^{-1}$  for the hydrolysate and captopril, respectively. Again, the shrimp by-product hydrolysate showed an important tyrosinase inhibitory effect even though the  $\text{IC}_{50}$  was higher than the value determined for Kojic acid,  $107.67 \pm 33 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $4.05 \pm 0.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively. Finally, the shrimp hydrolysate also displayed a promising activity against amylase; its  $\text{IC}_{50}$  ( $133.24 \pm 0.67 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) was remarkably lower than that obtained with acarbose ( $570.16 \pm 1.82 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (Figure 3). For the deproteinization of shrimp bio-wastes, a percent of 48% and 82% has been recorded after by M1V and Nari2A<sup>T</sup> proteases.

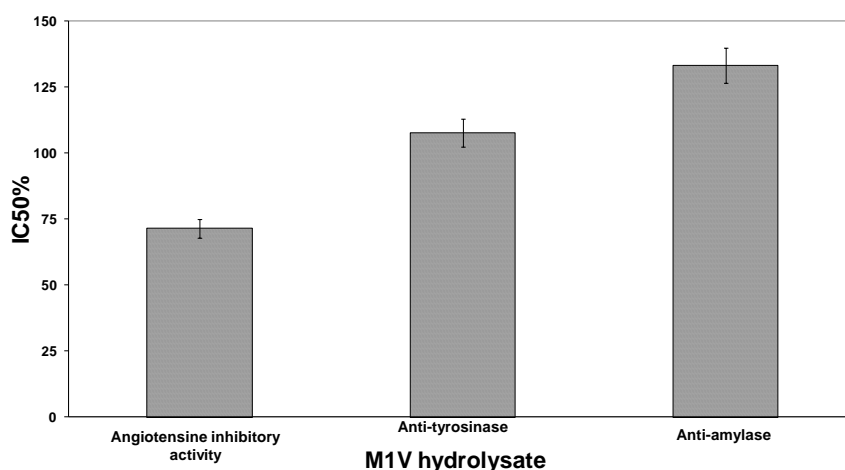


Figure 3: Assessment of enzyme inhibitory potential.

#### 4. Conclusion

Four extremophilic strains, identified as *Aeribacillus pallidus* strain VP3, *Anoxybacillus kamchatkensis* M1V, *Virgibacillus natechei* strain FarD<sup>T</sup>, and *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A<sup>T</sup> were selected as producers of extracellular proteases with high activity ( $3,000 \text{ U.mL}^{-1}$  to  $16,000 \text{ U.mL}^{-1}$ ) and solvent-stability (residual activities varying attaining 481%) at alkaline pH ranges and high temperatures. The crude preparations showed a great for enhancing the washing performance various solid and liquid detergents with excellent washing performance when added to laundry detergents. In this study, we also

demonstrated that the culture supernatant can deproteinize shrimp wastes, with a high deproteinization degree (82%). More interestingly, the recuperated protein hydrolysate showed an interest remarkable biological activity. Again, these crude preparations showed high stability in the presence of organic solvents. Thus, the present study describes for the use of proteases from extremophilic bacteria as a new and promising opportunity in various bioprocesses and biotechnological researches.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Mrs. N. Masmoudi and Mr. K. Walha (Analysis Unit-CBS)<sup>3</sup> for their technical assistance. We extend our thanks to Prof. M. Chamkha (LEBP-CBS, Tunisia)<sup>4</sup> for his kind gift of the *Aeribacillus pallidus* strain VP3 and Dr. N. Ammara Addou and Prof. F. Nateche (LBCM, FSB-USTHB, Algeria)<sup>5</sup> for their generous gift of the *Melghiribacillus thermohalophilus* sp. nov., gen. nov., Nari2A<sup>T</sup> and the *Virgibacillus natechei* sp. nov., FarD<sup>T</sup> strains respectively.

## Funding information

This work was supported by the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS)<sup>6</sup>” in Tunisia in the framework of the Contract Programs LBMIE-CBS, code grant no.: LR15CBS06 (2015-2018) and LBMEB-CBS, code grant no.: LR19CBS01 (2019-2022), the Multilateral Project Partenariats Hubert Curien (PHC)-Maghreb 2020 Program (FranMaghZYM 2020-2023, code Campus France: 43791TM & code PHC: 01MAG20), and the Algerian-Tunisian R&I Cooperation for the Mixed Laboratories of Scientific Excellence 2021-2024 (Hydro-BIOTECH, code LABEX/TN/DZ/21/01).

## Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- [1] Bang C., Dagan T., Deines P., Dubilier N., Duschl W.J., Fraune S., Hentschel U., Hirt H., Hülter N., Lachnit T., Metaorganisms in extreme environments: Do microbes play a role in organismal adaptation, *Zoology* 127 (2018) 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2018.02.004>
- [2] Neifar S., Ben Hlima H., Mhiri S., Mezghani M., Bouacem K., Ibrahim A.H., Jaouadi B., Bouanane-Darenfed A., Bejar S., A novel thermostable and efficient class II glucose isomerase from the thermophilic *Caldicoprobacter algeriensis*: Biochemical characterization, molecular investigation, and application in high fructose syrup production, *International Journal of Biological*

- Macromolecules* 129 (2019) 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.150>
- [3] Mhiri S., Bouanane-Darenfed A., Jemli S., Neifar S., Ameri R., Mezghani M., Bouacem K., Jaouadi B., Bejar S., A thermophilic and thermostable xylanase from *Caldicoprobacter algeriensis*: Recombinant expression, characterization and application in paper biobleaching, *International Journal of Biological Macromolecules* 164 (2020) 808-817. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.162>
- [4] Ben Elhouli M., Zrafi N., Jaouadi B., Rekik H., Bejar S., Boukour Touiou S., Hmidi M., Badis A., Bejar S., Jaouadi B., A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650, *International Journal of Biological Macromolecules* 79 (2015) 871-882. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.006>
- [5] Muthu S., Gopal V.B., Soundararajan S., Nattarayan K., Narayan K. S., Lakshmikantham M., Malairaj S., Perumal P., Antibacterial serine protease from *Wrightia tinctoria*: Purification and characterization, *Plant Physiology and Biochemistry* 112 (2017) 161-172. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.003>
- [6] Omrane Benmradi M., Gargouri W., Mahfoudh D., Kriaa M., Jaouadi B., Kechaou N., Response surface methodology optimization of milk-clotting protease produced by *Pleurotus sajor-caju* strain CTM 10057 and its technico-economical evaluation, *Algerian Journal of Environmental Science and Technology* 6 (4) (2020) 1658-1666. <https://www.aljest.org/index.php/aljest/article/view/360>
- [7] Elleuche S., Schäfers C., Blank S., Schröder C., Antranikian G., Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes, *Current Opinion in Microbiology* 25 (2015) 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.05.011>
- [8] Rahem F., Badis A., Zenati B., Mechri S., Hadjidj R., Rekik H., Eddouaouda K., Annane R., Jaouadi B., Characterization of a novel serine alkaline protease from *Bacillus atrophaeus* NIJ as a thermophilic hydrocarbonoclastic strain and its application in laundry detergent formulations, *Algerian Journal of Environmental Science and Technology* 7(1) (2021) 1707-1724. <https://www.aljest.org/index.php/aljest/article/view/365>
- [9] Mechri S., Ben Elhouli Berrouina M., Omrane Benmradi M., Zrafi Jaouadi N., Rekik H., Moujehed E., Chebbi A., Sayadi S., Chamkha M., Bejar S., Characterization of a novel protease from *Aeribacillus pallidus* strain VP3 with potential biotechnological interest, *International Journal of Biological Macromolecules* 94 (2017) 221-232. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.112>
- [10] Tavano O.L., Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 90 (2013) 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>
- [11] Bouacem K., Bouanane-Darenfed A., Zrafi Jaouadi N., Joseph M., Hacene H., Ollivier B., Fardeau M.-L., Bejar S., Jaouadi B., Novel serine keratinase from *Caldicoprobacter algeriensis* exhibiting outstanding hide dehairing abilities, *International Journal of Biological Macromolecules* 86 (2016) 321-328. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.074>
- [12] Toplak A., Nuijens T., Quaedflieg P.J.L.M., Wu B., Janssen D.B., Peptide synthesis in neat organic solvents with novel thermostable proteases, *Enzyme and Microbial Technology* 73-74 (2015) 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.03.003>
- [13] Chalamaiah M., Yu W., Wu J., Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review, *Food Chemistry* 245 (2018) 205-222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.087>
- [14] Mechri S., Sellem I., Bouacem K., Jabour F., Chamkha M., Hacene H., Bouanane-Darenfed A., Jaouadi B., Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities of *Metapenaeus monoceros* by-product hydrolysates elaborated by purified alkaline proteases, *Waste and Biomass Valorization* (2020) 1-15. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00942-5>

<sup>3</sup> <http://www.cbs.mrt.tn/fra/home>

<sup>4</sup> <http://www.cbs.mrt.tn/eng/pages/84/presentation>

<sup>5</sup> <https://lbcm.usthb.dz>

<sup>6</sup> <https://www.mesrs.dz/accueil>

- [15] Mechri S., Sellem I., Bouacem K., Jabeur F., Laribi-Habchi H., Mellouli L., Hacène H., Bouanane-Darenfed A., Jaouadi B., A biological clean processing approach for the valorization of speckled shrimp *Metapenaeus monoceros* by-product as a source of bioactive compounds, *Environmental Science and Pollution Research* 27 (2020) 15842-15855. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08076-w>
- [16] Bouacem K., Caractérisation de souches bactériennes isolées à partir de sources thermales du Nord-Algérien: Etude des propriétés enzymatiques Thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle LMD en Microbiologie Appliquée USTHB (189p) (2016). <http://hdl.handle.net/123456789/5413>
- [17] Ouelhadj A., Bouacem K., Asmani K-L., Allala F., Mechri S., Yahiaoui M., Jaouadi B., Identification and homology modeling of a new biotechnologically compatible serine alkaline protease from moderately halotolerant *Gracilibacillus boracitolerans* strain LO15, *International Journal of Biological Macromolecules* 161 (2020) 1456-1469. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.266>
- [18] Mnif S., Sayadi S., Chamkha M., Biodegradative potential and characterization of a novel aromatic-degrading bacterium isolated from a geothermal oil field under saline and thermophilic conditions, *International Biodeterioration & Biodegradation* 86 (2014) 258-264. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.015>
- [19] Mechri S., Bouacem K., Zaráf Jaouadi N., Rekik H., Elhoul M.B., Benmrád M.O., Hacene H., Bejar S., A. Bouanane-Darenfed, B. Jaouadi, Identification of a novel protease from the thermophilic *Anoxybacillus kamchatkensis* M1V and its application as laundry detergent additive, *Extremophiles* 23 (2019) 687-706. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01105-8>
- [20] Amziane M., Metiaz F., A. Darenfed-Bouanane, Z. Djenane, O. Selama, A. Abderrahmani, J. L. Cayol, M. L. Fardeau, *Virgibacillus natechei* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from sediment of a saline lake in southwest of Algeria, *Current Microbiology* 66 (2013) 462-466. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1171-0>
- [21] Amara Addou N., Schumann P., Spröer C., Hania W.B., Hacene H., Fauque G., Cayol J. L., Fardeau M. L., *Melghiribacillus thermohalophilus* gen. nov., sp. nov., a novel filamentous, endospore-forming, thermophilic and halophilic bacterium, *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 65(4) (2015) 1172-1179. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000075/sidebyside>
- [22] Gürtler V., Stanisch V.A., New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region, *Microbiology* 142 (1996) 3-16. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-1-3>
- [23] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, pp. 23-38. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(83\)90068-7](https://doi.org/10.1016/0307-4412(83)90068-7)
- [24] Kembhavi A.A., Buttler D.J., Knight C.G., Barrett A.J., The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303 (1993) 208-213. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1274>
- [25] Boulkour Touiou S., Zaráf Jaouadi N., Boudjella H., Ferradji F.Z., Belhoul M., Rekik H., Badis A., Bejar S., Jaouadi B., Purification and biochemical characterization of two detergent-stable serine alkaline proteases from *Streptomyces* sp. strain AH4, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31 (2015) <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1858-6>
- [26] Younes I., Hajji S., Frachet V., Rinaudo M., Jellouli K., Nasri M., Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules* 69 (2014) 489-498. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.013>
- [27] Hammami A., Hamdi M., Abdelhedi O., Jridi M., Nasri M., Bayouh A., Surfactant-and oxidant-stable alkaline proteases from *Bacillus invictae*: Characterization and potential applications in chitin extraction and as a detergent additive, *International Journal of Biological Macromolecules* 96 (2017) 272-281. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.035>
- [28] Zhang H., Fei X., Tian J., Li Y., Zhi H., Wang K., Xu L., Wang Y., Synthesis and continuous catalytic application of alkaline protease nanoflowers-PVA composite hydrogel, *Catalysis Communications* 116 (2018) 5-9. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2018.07.015>
- [29] Matsumoto T., Kitayama R., Yamada R., Ogino H., The synthesis of l-glycyl-l-tyrosine derivatives using organic-solvent stable PST-01 protease from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01, *Process Biochemistry* 102 (2021) 186-189. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.01.005>
- [30] Jaouadi B., Zaráf Jaouadi N., Rekik H., Naili B., Beji A., Dhoubi A., Bejar S., Biochemical and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* CTM50182 organic solvent-stable elastase, *International Journal of Biological Macromolecules* 60 (2013) 165-177. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.019>
- [31] Jaouadi B., Abdelmalek B., Fodil D., Ferradji F.Z., Rekik H., Zaráf N., Bejar S., Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents, *Bioresource Technology* 101(21) (2010) 8361-8369. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.066>
- [32] Patil U., Chaudhari A., Production of alkaline protease by solvent-tolerant alkaliphilic *Bacillus circulans* MTCC 7942 isolated from hydrocarbon contaminated habitat: process parameters optimization, *ISRN Biochemistry* 2013 (2013) ID 942590. U. Patil, A. Chaudhari, Production of alkaline protease by solvent-tolerant alkaliphilic *Bacillus circulans* MTCC 7942 isolated from hydrocarbon contaminated habitat: process parameters optimization, *ISRN Biochemistry* 2013 (2013) ID 942590. <https://doi.org/10.1155/2013/942590>
- [33] Qureshi A., Simair A., Ali C., Khushk I., Khokhar J., Ahmed A., Danish M., Lu C., Production, purification and partial characterization of Organo-Solvent tolerant protease from newly isolated *Bacillus* sp. BBXS-2. *Ferment Technol* 7 (2018) 7:1. <https://doi.org/10.4172/2167-7972.1000151>
- [34] Devi Rajeswari V., Jayaraman G., Rameshpathy M., Sridharan T., Production and characterization of extracellular protease from halotolerant bacterium *Virgibacillus Dokdonesis* Vitp14, *Research Journal of Biotechnology* 7 (2012) 38-43. <https://doi.org/10.4172/2167-7972.1000151>
- [35] Rekik H., Zaráf Jaouadi N., Gargouri F., Bejar W., Frihka F., Jmal N., Bejar S., Jaouadi B., Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12, *International Journal of Biological Macromolecules* 121 (2019) 1227-1239. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.139>
- [36] Hadjidj R., Badis A., Mechri S., Eddouaouda K., Khelouia L., Annane R., El Hattab M., Jaouadi B., Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A, *International Journal of Biological Macromolecules* 114 (2018) 1033-1048. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.167>
- [37] Jemil I., Abdelhedi O., Nasri R., Mora L., Jridi M., Aristoy M-C., Toldrá F., Nasri M., Novel bioactive peptides from enzymatic hydrolysate of Sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle proteins hydrolysed by *Bacillus subtilis* A26 proteases, *Food Research International* 100 (2017) 121-133. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.018>



Soumis le : 30/12/2020

Forme révisée acceptée le : 30/05/2021

Auteur Correspondant: [s.lagha@univ-boumerdes.dz](mailto:s.lagha@univ-boumerdes.dz)



**Revue  
Nature et Technologie**

<http://www.univ-chlef.dz/revuenatec>

ISSN : 1112-9778 – E-ISSN : 2437-0312

# Etude comparative de l'influence de la désamerisation par le sel sur la qualité sensorielle de deux confitures : bigarade et pamplemousse

Samira LAGHA-BENAMROUCHE <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara, Boumerdès 035000, Algérie

<sup>b</sup> Laboratoire de recherche Technologie douce, Valorisation, Physicochimie de Matériel Biologique et Biodiversité, Faculté des Sciences, Université UMBB, Boumerdès 35000, Algérie

## Résumé

Ce travail a pour objectif la comparaison de l'influence de la méthode de désamerisation sur la qualité sensorielle de deux confitures : bigarade et pamplemousse. Le sel, la chaleur et l'eau sont considérés comme des éléments moteurs dans l'opération de désamerisation. Dans le cadre de cette étude le facteur sel a été variable ; six taux de sel ont été fixés au cours de cette opération. Ils correspondent aux six pourcentages (0 ; 0,3125 ; 0,625 ; 1,25 ; 2,5 et 5 %) de sel pris en fonction du poids du fruit. Les résultats montrent que l'amertume a disparu totalement pour des concentrations de 2,5 % pour la bigarade et 5 % pour le pamplemousse. Les résultats montrent également que c'est la confiture de bigarade, désamérisée à la concentration en sel de 2,5 %, qui est la plus appréciée. Le test de préférence montre que c'est la confiture de bigarade qui est la plus préférée pour toutes les concentrations testées.

Mots-clés : Bigarade ; Pamplemousse ; Confiture ; Désamérisation ; Qualité sensorielle.

## *Comparative study of the influence of desamerization by salt on the sensory quality of two jams: bitter orange and grapefruit*

## Abstract

The objective of this work is the comparison of the influence of the desamerization method on the sensory quality of two jams: bitter orange and grapefruit. Salt, heat and water are considered to be the driving forces in the desamerization operation. In the context of this study, the salt factor was variable; six salt levels were set during this operation. They correspond to the six percentages (0; 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5 and 5%) of salt taken according to the weight of the fruit. The results show that the bitterness has completely disappeared for concentrations of 2.5% for bitter orange and 5% for grapefruit. The results also show that bitter orange jam, desamerized at a salt concentration of 2.5%, is the most appreciated. The preference test shows that bitter orange jam is the most preferred for all the concentrations tested.

Keywords: Bigarade; Grapefruit; Jam; Desamerization; Sensory quality.

## 1. Introduction

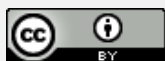
La grande famille de *Rutaceae* (Rutacées) désigne aussi bien les arbres et arbustes des genres *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus*, plus rarement des plantes herbacées des zones tempérées. Avec ces 145 espèces dénombrées, le genre *Citrus*, qui donne les fruits communément appelés « agrumes<sup>1</sup> », est le plus important. C'est au sein de ce genre que se rencontrent les principales espèces d'agrumes consommées : les

citrons, les pamplemousses, les mandarines, les clémentines, les kumquats, la lime (citron vert) et le pomélo [1,2].

Les agrumes sont consommés généralement crus ou sous forme de jus en raison de leur valeur nutritive élevée<sup>2</sup> et de leur saveur particulière [3]. Parmi les agrumes on trouve le pamplemousse (*Citrus maxima* L.) et la bigarade (*Citrus aurantium* L.) qui sont peu cultivés en Algérie. Ils sont rarement consommés frais

<sup>1</sup> Mot d'origine italienne, du latin médiéval « acrumen », qui signifie saveur âcre

<sup>2</sup> <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/saine-alimentation/donnees-nutritionnelles/tableau-5-fruits-fruits-valeur-nutritive-quelques-aliments-usuels-2008.html>



Ceci est un document en libre accès selon les termes de [Creative Commons Attribution License CC-BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), ce qui permet de le partager, copier, reproduire, distribuer, communiquer, réutiliser ou de l'adapter avec l'obligation de créditer son auteur.

car ils sont très acides. La présence de certains flavonoïdes (Neohesperidine, Naringine, ...etc.) dans leurs écorces donne aux fruits un goût amer, qui est ressenti dans les préparations des confitures à bases de ces fruits [4,5]. Ces derniers sont caractérisés par leur richesse en eau, en fibres alimentaires (pectines, cellulose, et autre polysaccharides), en minéraux, en vitamines et en métabolites secondaires (les huiles essentielles et les composés phénoliques) à potentiel antioxydant important [6]. L'oranger amer ou le bigaradier est inscrit dans la liste des 454 plantes médicinales<sup>3</sup> inscrites à la Pharmacopée Française établie en Janvier 2021 pouvant bénéficier d'une autorisation de mise sur le marché (AMM)<sup>4</sup> en tant qu'alimentaire (Avis aux fabricants n°90/22 bis de 1990) et qui contient 35 indications thérapeutiques approuvées.

Ce travail consiste à étudier et à comparer l'influence de la désamérisation par le sel sur la qualité sensorielle des confitures à base de bigarade et de pamplemousse. Le travail s'inscrit dans la perspective de valoriser le pamplemousse et la bigarade (réservoir de composés phytochimiques) sous forme de confiture par la désamérisation de leurs écorces, qui est source d'amertume, par la technique de salaison.

#### Matériels et méthodes

##### 1.1. Collecte des échantillons

L'orange amère (*Citrus aurantium* L. cv. Bigarade) et le pamplemousse (*Citrus maxima* L. cv. Blanc) ont été récoltés à Boumerdes (région située à 45 Km à l'Est de la capitale Alger) La récolte a été faite d'une manière aléatoire à partir de plusieurs arbres appartenant à la même variété durant la période janvier et février de l'année 2018.

##### 1.2. Désamérisation des écorces et préparation des confitures

###### 1.2.1. Désamérisation

Le sel, la chaleur et l'eau sont considérés comme des éléments indispensables à l'opération de désamérisation.

Dans le cadre de cette étude, le facteur sel était la variable. Ainsi, six taux (0 ; 0,3125 ; 0,625 ; 1,25 ; 2,5 et 5 %) ont été utilisés, et ce, en fonction du poids du fruit. L'écorce du fruit préalablement coupée en morceaux, et immergée dans de l'eau salée pendant 4 heures, puis préchauffée dans des marmites en Inox pendant cinq (5) minutes après ébullition. L'eau chaude versée et ensuite remplacée par de l'eau froide avec l'ajout de sel pour le trempage (3 fois à intervalle de 4 heures). Le dernier préchauffage est réalisé avec de l'eau sans sel pour dessaler les écorces et éliminer l'auxiliaire.

###### 1.2.2. Cuisson

Les écorces ont été égouttées et les quartiers du fruit nettoyés, coupés en petits morceaux de 2×3 cm et les pépins mis dans un nouet. Les fruits ont été pesés et le même poids d'eau a été pris avec 1,5 fois de sucre pour préparer le sirop. Ce dernier a été laissé cuit jusqu'au perlé. A ce moment, les fruits et le nouet sont ajoutés et l'ensemble a été cuit pendant 45 à 50 minutes en écumant. Au cours de l'ébullition, la température et la concentration en sucre ont été contrôlées. Cette dernière a été arrêtée quand la concentration a atteint (60 à 65<sup>0</sup>Brix)<sup>5</sup> à l'aide d'un réfractomètre.

##### 1.3. Evaluation sensorielle

###### 1.3.1. Test de classement

L'épreuve de classement est utilisée lorsque l'on suspecte que les produits diffèrent sur une caractéristique organoleptique précise ; elle permet ainsi de comparer directement les produits entre eux. La tâche du dégustateur consistait à lui présenter une série de confitures codée et à lui demander de les classer par ordre d'intensité d'amertume. Les échantillons sont présentés simultanément dans un ordre croissant (ou décroissant) d'intensité d'amertume. Chaque dégustateur avait reçu les produits à déguster et devait répondre à un questionnaire pour chaque type de confiture à part.

<sup>3</sup> <https://ansm.sante.fr/uploads/2021/03/25/liste-a-des-plantes-medicinales-utilisees-traditionnellement-4.pdf>

<sup>4</sup> Processus d'enregistrement en Algérie : [http://staff.univ-batna2.dz/sites/default/files/ouahab-ammur/files/autorisation\\_de\\_mise\\_sur\\_le\\_marche.pdf](http://staff.univ-batna2.dz/sites/default/files/ouahab-ammur/files/autorisation_de_mise_sur_le_marche.pdf)

<sup>5</sup> Brix : L'échelle de mesure de la fraction de saccharose dans un liquide, c'est-à-dire le pourcentage de matière sèche soluble.

### 1.3.2. Epreuve hédonique

L'épreuve hédonique a pour objectif d'évaluer le degré d'appréciation du produit par un consommateur. Cette épreuve est utilisée lorsque les produits sont différents et que l'on connaît les caractéristiques sensorielles sur lesquelles les produits peuvent être différents.

#### 1.3.2.1. Test hédonique

L'importance de ce test réside dans le fait qu'il ne nécessite pas l'évaluation simultanée de tous les produits étudiés dans un ordre bien défini ; mais il suppose une bonne mémoire sensorielle l'échelle de notation. Une fois codifiés, les produits ont été présentés à un panel de 35 dégustateurs, chacun d'eux a reçu les échantillons dans des gobelets codés à trois chiffres. L'ordre de présentation des échantillons a été aléatoire. Chaque dégustateur devait répondre à un questionnaire pour chaque type de confiture à part.

#### 1.3.2.2. Test de préférence

Ce test permet au consommateur de faire un choix entre deux produits ; il choisit un échantillon par rapport à un autre ou il n'a pas de préférence. Des produits codifiés ont été présentés devant les 36 dégustateurs (36 dégustateurs pour le test de préférence pour les autres tests 35 dégustateurs parce que pour le test de préférence avec 35 dégustateurs on ne retrouve pas la valeur sur la table du test binominal à deux queues). Chaque dégustateur reçoit à la fois les deux confitures (bigarade et pamplemousse) de même concentration en sel de désamérisation et devait répondre à un questionnaire.

### 1.4. Etude statistique

Nous avons appliqué le test de comparaisons multiples par paires des sommes des rangs pour déterminer quels sont les couples d'échantillons qui diffèrent entre eux. Pour les résultats de l'analyse hédonique, les catégories ont été converties en notations numériques allant de 1 à 9, où 1 correspond à « N'aime pas du tout » et 9 « Aime beaucoup ». Les notations de chaque échantillon sont présentées sous forme de tableaux et analysées au moyen de l'analyse de variance,

à un facteur sans répétition, pour déterminer s'il y a des différences significatives dans le degré d'appréciation moyen entre les échantillons.

Concernant les résultats du test de préférence on s'est servi de la table du test binominal à deux queues pour l'interprétation des résultats [7].

## 2. Résultats et Discussions

Le présent travail a fait uniquement l'objet d'une comparaison avec nos données bibliographiques. La base de données investie n'apporte pas d'autres résultats publiés sur les procédés de désamérisation et leur influence sur la qualité nutritionnelle et sensorielle des produits. Le présent travail est une initiation dans cet axe de recherche.

### 2.1. Classements selon le degré d'amertume

Pour traiter les données issues des tests de classement, dans un premier temps nous avons calculé toutes les différences entre les sommes des rangs des produits pris 2 à 2. Puis, dans un second temps, on a lu la valeur critique à l'intersection de la colonne (produits) et de la ligne (dégustateurs) sur la table de Newell et Mac Farlane correspondante au risque  $\alpha \leq 5\%$ . Toute différence calculée entre les produits égale ou supérieure à cette valeur critique signifie que les produits correspondants peuvent être considérés comme différents.

Les résultats du tableau 1 montrent que les valeurs calculées, à partir des comparaisons multiples par paires, pour les confitures désamérisées et la confiture amère de bigarade sont supérieures à la valeur critique. La différence d'amertume perçue entre la confiture amère et les confitures désamérisées est significative. Les dégustateurs trouvent que ces dernières sont perçues moins amères ( $p < 0,05$ ). La confiture amère est classée donc dans un groupe différent des autres, soit le groupe (A).

Les comparaisons multiples par paires des trois confitures désamérisées avec le NaCl aux pourcentages suivants : 0,3125 % ; 0,625 % et 1,25 % ont conduit à l'absence de différence significative dans le degré de désamérisation entre ces dernières ; les dégustateurs trouvent que ces confitures sont moins amères que la

---

précédente mais ne diffèrent pas entre elles, elles sont donc classées dans un autre groupe (B).

La valeur calculée pour les confitures désamérisées avec le NaCl aux pourcentages : 1,25 % et 2,5 % est supérieure à la valeur critique. On conclut que la

différence d'amertume perçue entre les deux échantillons est significative et les deux confitures sont classées dans deux groupes différents.

Tableau 1

Comparaisons multiples par paires des sommes des rangs pour le degré d'amertume de la confiture de bigarade.

Echantillons	Effectif (n)	Somme des rangs	Différences des rangs entre les paires possibles	Valeur critique pour $p \leq 0,05$ Nombre de produits = 5	Groupes
Amère (1)	35	61	(2)-(1) = 40* (3)-(1) = 42* (4)-(1) = 42* (5)-(1) = 83*	37	A
CD NaCl 0,312 % (2)	35	101	(3)-(2) = 02 (4)-(2) = 02 (5)-(2) = 43*	37	B
CD NaCl 0,625 % (3)	35	103	(4)-(3) = 00 (5)-(3) = 41*	37	B
CD NaCl 1,25 % (4)	35	103	(5)-(4) = 41*	37	B
CD NaCl 2,5 % (5)	35	144			C

CD : Confiture désamérisée, \* : Significatif au seuil  $p \leq 0,05$

Les résultats du tableau 2 montrent que les valeurs calculées à partir des comparaisons multiples par paires pour les confitures désamérisées et la confiture amère de pamplemousse sont supérieures à la valeur critique.

La différence d'amertume perçue entre la confiture amère et les confitures désamérisées est significative.

Les dégustateurs trouvent que ces dernières sont perçues moins amères ( $p < 0,05$ ). La confiture amère est classée donc dans un groupe différent des autres, soit le groupe (A).

Tableau 2

Comparaisons multiples par paires des sommes des rangs pour le degré d'amertume de la confiture de pamplemousse.

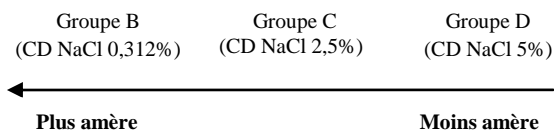
Echantillons	Effectif (n)	Somme des rangs	Différences des rangs entre les paires possibles	Valeur critique pour $p \leq 0,05$ Nombre de produits=6	Groupes
Amère (1)	35	36	(2)-(1) = 62* (3)-(1) = 93* (4)-(1) = 88* (5)-(1) = 108* (6)-(1) = 162*	45	A
CD NaCl 0,312 % (2)	35	98	(6)-(2) = 100* (5)-(2) = 46* (4)-(2) = 26 (3)-(2) = 31	45	B
CD NaCl 0,625 % (3)	35	129	(6)-(3) = 69* (5)-(3) = 15 (3)-(4) = 05	45	BC
CD NaCl 1,25 % (4)	35	124	(6)-(4) = 74* (5)-(4) = 20	45	BC
CD NaCl 2,5 % (5)	35	144	(6)-(5) = 54*	45	C
CD NaCl 5 % (6)	35	198			D

CD : Confiture désamérisée, \* : Significatif au seuil  $p \leq 0,05$





La comparaison multiple des paires de confitures : (CD NaCl 0,312 % - CD NaCl 2,5 %) et (CD NaCl 2,5 % - CD NaCl 5 %) montre que la valeur calculée pour chaque paire est supérieure à la valeur critique. Les dégustateurs trouvent que ces confitures sont différentes ( $p < 0,05$ ) du point de vue amertume et les classent dans des groupes différents selon l'intensité d'amertume :



Pour les deux confitures : CD NaCl 0,625 % et CD NaCl 1,25 %, la valeur calculée est inférieure à la valeur critique. Ces deux confitures sont placées dans le même groupe.

Les comparaisons multiples par paires montrent que les confitures CD NaCl 0,625 % et CD NaCl 1,25 % ne diffèrent pas significativement des confitures CD NaCl 0,3125 % et CD NaCl 2,5 %. Les deux confitures CD NaCl 0,625 % et CD NaCl 1,25 % sont donc placées dans un groupe intermédiaire entre celui de CD NaCl 0,3125 % et de CD NaCl 2,5 % ; soit le groupe BC.

Notre résultat est en accord avec ceux de Lagha-Benamrouche *et al.* [8] et Lagha-Benamrouche et Benkaci [9], Ces derniers rapportent le sel de table diminue significativement ( $p \leq 0,05$ ) l'amertume des confitures à base de bigarade et de pamplemousse, respectivement. Ces mêmes auteurs, rapportent également que la désamérisation diminue l'acidité, les sucres, les protéines et les teneurs en composés bioactifs (vitamine C, caroténoïdes et polyphénols) et augmente le taux de cendres. Les confitures désamérisées présentaient une faible teneur en antioxydants par rapport à la confiture amère mais indépendamment de ça elle reste une bonne source de composés bioactifs avec un potentiel antioxydant dans l'alimentation. Selon

Lagha-Benamrouche et Benkaci [9], la confiture désamérisée de pamplemousse montre un potentiel antioxydant plus prononcé (56,35 % à 86,34 %) en comparaison avec celle de bigarade (22,48 % à 56,23 %) [8] et les confitures de cerise, d'abricot et de figue (10,06 % ; 9,95 % et 8,96 %, respectivement), selon Rababah *et al.* [10].

## 2.2. Epreuve hédonique

Les méthodes hédoniques portent sur les préférences des consommateurs et ont pour but de comparer l'appréciation hédonique globale de différents produits en se focalisant sur les ressentis individuels liés au plaisir ou déplaisir provoqué par l'aliment. Contrairement à l'analyse sensorielle descriptive, ces méthodes font appel à des dégustateurs naïfs n'ayant eu aucune pratique de l'analyse sensorielle [11].

### 2.2.1. Test de préférence

Les résultats du test de préférence (Tableau 3) sont analysés en se servant du test binominal à deux queues. On utilise la table à deux queues avec :

X : Nombre de dégustateurs ayant majoritairement choisis l'une des deux confitures (pamplemousse ou Bigarade)

n : Nombre total des dégustateurs.

Les résultats montrent que pour toutes les paires analysées, les valeurs lues sur la table sont inférieures au risque  $\alpha$  (5 %). Cela signifie que quel que soit la concentration en sel utilisée pour la désamérisation, les dégustateurs préfèrent significativement la confiture de Bigarade à celle du pamplemousse. Les dégustateurs trouvent qu'elle semble être la moins amère pour toutes les concentrations de sel testées. Les dégustateurs constatent également que la confiture de pamplemousse perd son amertume à une concentration en sel de 5 % MF.

Tableau 3  
Résultats du test de préférence

	Nombre de dégustateur préférant la confiture de Bigarade	Nombre de dégustateur préférant la confiture de pamplemousse	Valeur critique pour n =36 et $\alpha=5\%$
Amère	30	5	0,001*
CD NaCl 0,312 %	25	10	0,047*
CD NaCl 0,625 %	25	10	0,047*
CD NaCl 1,25 %	25	10	0,047*
CD NaCl 2,5 %	25	10	0,047*

CD : Confiture désamérisée, \* : Significatif au seuil  $p \leq 0,05$

### 2.2.2. Test de notation hédonique

Le test de notation hédonique vise à capturer le statut hédonique d'un ou plusieurs produits dans le but de les comparer. Pour cela il est demandé aux dégustateurs de noter les produits présentés généralement successivement, sur une échelle dite

d'intervalle numérique. Néanmoins, l'échelle hédonique à 9 points semble être la plus fréquemment utilisée dans la littérature [12].

Les catégories descriptives ont été converties en notations numériques ; les résultats par catégorie du test hédoniques sont donnés par les tableaux 4 et 5.

Tableau 4  
Résultats par catégorie de test hédonique des confitures désamérisées de Bigarade

Nombre de dégustateurs	Confitures désamérisée (Traitement)				Dégustateur total	Dégustateur moyenne
	CD NaCl 0,3125 %	CD NaCl 0,625 %	CD NaCl 1,25 %	CD NaCl 2,5 %		
1	2	2	1	7	12	3
2	7				7	1,75
3	3	1	1	8	13	3,25
5	4		3		7	1,75
7		4			4	1
9	6	6			12	3
10			7		7	1,75
15	5	7			13	3,25
16			8		8	2
31				9	9	2,25
Total traitement	175	192	217	310		
Grand total					92	
Moyenne traitement	5	5,5	6,2	8		

CD : Confiture désamérisée.

Tableau 5  
Résultats par catégorie de test hédonique des confitures désamérisées de pamplemousse

Nombre de dégustateurs	Confitures désamérisée (traitement)					Dégustateur total	Dégustateur moyenne
	CD NaCl	CD NaCl	CD NaCl	CD NaCl	CD NaCl		
	0,3125 %	0,625 %	1,25 %	2,5 %	2,5 %		
2		7	8	1		16	3,2
3			1	5		6	1,2
5			7			7	1,4
6		2				2	0,4
7	4		3			7	1,4
8			4			4	0,8
10	3		5	6	6	20	4
12		3				3	0,6
15		4				4	0,8
18	2					2	0,4
20				7		7	1,4
25					8	8	1,6
Total traitement	74	122	157	217	260		
Grand total						86	
Moyenne traitement	2,1	3,5	4,5	6,2	7,4		

CD : Confiture désamérisée.

Les coefficients F pour le traitement et les dégustateurs ont été calculés en divisant les valeurs de carrés moyens (CM) respectives par le CM de l'erreur. Les coefficients F calculés doivent dépasser celles dans le tableau de distribution F (signification à  $p \leq 5\%$ )<sup>6</sup>. Les tableaux 6 et 7 de l'analyse de variance résument les résultats obtenus pour la somme des carrés, les degrés de liberté et des coefficients F pour les confitures de Bigarade et de pamplemousse, respectivement.

Tableau 6  
Analyse de la variance pour le test hédonique de la confiture de bigarade.

Source de la variation	DI	SC	CM	Coefficient F	
				Calculé	Table ( $p \leq 0,05$ )
Total (T)	119	572			
Traitement (Tr)	3	306	76,4	25,13	2,68
Dégustateurs (D)	34	132,3	12,02	3,95	1,55
Erreurs (E)	82	133,7	3,04		

DI : Degrés de liberté, SC : Somme des carrés, CM : Carré moyen.

Tableau 7 :  
Analyse de la variance pour le test hédonique de la confiture de pamplemousse.

Source de la variation	DI	SC	CM	Coefficient F	
				Calculé	Table ( $p \leq 0,05$ )
Total (T)	174	157,9			
Traitement (Tr)	4	129,9	32,48	29,9	2,37
Dégustateurs (D)	34	32,7	12,32	14,67	1,46
Erreurs (E)	136	20,17	0,84		

DI : Degrés de liberté, SC : Somme des carrés, CM : Carré moyen.

Pour la confiture de Bigarade, le coefficient F calculé pour le traitement (F 25,13) dépasse le coefficient du tableau (F 2,68), il a été conclu qu'il existe une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre les moyennes des résultats hédoniques pour les quatre confitures désamérisées. Les résultats indiquent également que le coefficient calculé pour les dégustateurs (F 3,95) dépasse le coefficient de la table (F 1,55). Un tel résultat révèle donc un effet significatif attribuable aux dégustateurs.

L'analyse de la variance a indiqué qu'il y avait des différences significatives entre les quatre confitures désamérisées.

<sup>6</sup> Voir annexe en fin d'article

Afin de déterminer quels échantillons de confiture diffèrent significativement de l'autre, un test de comparaison multiple a été effectué; [Le test de comparaison multiple de Duncan](#)<sup>7</sup>, utilisant les tables de valeurs critiques (valeurs Q) à un niveau de signification de 5 %. Ce test compare les différences entre toutes les paires de moyennes. Si la différence entre les paires de moyennes est supérieure à la valeur de l'écart calculé, cette différence est significative ( $p < 0,05$ ). Les valeurs des écarts sont calculées d'après le nombre de moyennes qui se trouve entre les deux moyennes testées, quand les moyennes sont classées par ordre de taille.

Confitures désamérisée	CD	CD	CD	CD
	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	0,3125 %	0,625 %	1,25 %	2,5 %
Moyenne traitement	5	5,5	6,2	8

Pour procéder au test de Duncan, les moyennes de traitement ont été placées dans l'ordre décroissant, comme indiqué ci-dessous :

Pour comparer les quatre moyennes de cet exemple, on a calculé la valeur des écarts pour une gamme de 4,3 et 2 moyennes avec l'équation suivante :

$$\text{Ecart} = Q \sqrt{\frac{CM(E)}{t}} \quad (1)$$

$$\text{Ecart} = Q (0,29)$$

t étant le nombre de réponses individuelles utilisées pour calculer chaque moyenne. Les valeurs de Q sont données à partir du tableau des valeurs critiques pour le test de comparaisons multiples de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

On a besoin de Df (E), soit de 82 degrés de liberté (Tableau 6), pour calculer la valeur de Q.

- Valeur de Q pour 4 moyennes= 3,045
- Valeur de Q pour 3 moyennes=2,947
- Valeur de Q pour 2 moyennes=2,8

Les valeurs des écarts sont les suivants :

- Ecart pour 4 moyennes= 3,045 (0,29) = 0,88
- Ecart pour 3 moyennes= 2,947 (0,29) = 0,85
- Ecart pour 2 moyennes= 2,8 (0,29) = 0,81

Lorsque la différence moyenne est supérieure à la valeur d'écart, la différence entre ces deux moyennes est

donc significative. On procède de la façon indiquée ci-dessous jusqu'à ce qu'on ait fait les comparaisons entre toutes les moyennes :

- 8-5= 3\* >0,88
- 8-5,5= 2,5\* >0,88
- 8-6,2= 1,8\* >0,88
- 6,2-5= 1,2\* >0,85
- 6,2-5,5= 0,7 <0,85
- 5,5-5= 0,5 <0,81

Les différences significatives entre les moyennes sont présentées ci-dessous en utilisant des lettres (a, b et c). Les moyennes suivies des lettres différentes diffèrent significativement au niveau de probabilité de 5 %.

Confitures désamérisée	CD	CD	CD	CD
	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
	0,3125 %	0,625 %	1,25 %	2,5 %
Moyenne traitement	5 (c)	5,5 (back)	6,2 (b)	8 (a)

Les résultats montrent que les dégustateurs ont préféré de manière significative la CD NaCl 2,5 % à tous les autres échantillons et trouvent qu'elle n'est pas du tout amère. Il en fut de même pour la CD NaCl 1,25 %. Les dégustateurs trouvent son amertume presque indétectable et ont moyennement apprécié les CD NaCl 0,625 % et CD NaCl 0,3125 %.

Pour la confiture de pamplemousse, le coefficient F calculé pour le traitement (F 29,9) dépasse le coefficient F du tableau 7 (F 2,37), nous concluons qu'il existe une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre les moyennes des résultats hédoniques pour les cinq confitures désamérisées. Les résultats indiquent également que le coefficient calculé pour les dégustateurs (F 14,67) dépasse le coefficient de la table (F 1,46). Un tel résultat révèle donc un effet significatif attribuable aux dégustateurs.

L'analyse de la variance a indiqué qu'il y avait des différences significatives entre les cinq confitures désamérisées. Afin de déterminer quels échantillons de confiture diffèrent significativement de l'autre, un test de comparaison multiple a été effectué.

Pour comparer les cinq moyennes, la valeur des écarts pour une gamme de 5,4, 3 et 2 moyennes a été calculé par l'équation (1) avec :  $\text{Ecart} = Q (0,15)$ . Les valeurs de Q étant données à partir du tableau des

<sup>7</sup> <https://www.statsoft.fr/concepts-statistiques/glossaire/t/test-duncan.html>

valeurs critiques pour le test de comparaisons multiples de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

On a besoin de DI (E), soit de 136 degrés de liberté (Tableau 7) pour calculer la valeur de Q.

- Valeur de Q pour 5 moyennes= 3,059
- Valeur de Q pour 4 moyennes= 3,017
- Valeur de Q pour 3 moyennes= 2,918
- Valeur de Q pour 2 moyennes= 2,77

Les valeurs des écarts sont les suivants :

- Ecart pour 5 moyennes= 3,059 (0,15) = 0,46
- Ecart pour 4 moyennes= 3,017 (0,15) = 0,45
- Ecart pour 3 moyennes= 2,918 (0,15) = 0,43
- Ecart pour 2 moyennes= 2,77 (0,15) = 0,41

On procède de la même façon, comme indiqué précédemment, jusqu'à ce qu'on ait fait les comparaisons entre toutes les moyennes :

- $7,4 - 2,1 = 5,3^* > 0,46$
- $7,4 - 3,5 = 3,9^* > 0,46$
- $7,4 - 4,5 = 2,9^* > 0,46$
- $7,4 - 6,2 = 1,2^* > 0,46$
- $6,2 - 2,1 = 4,1^* > 0,45$
- $6,2 - 3,5 = 2,7^* > 0,45$
- $6,2 - 4,5 = 1,7^* > 0,45$
- $4,5 - 3,5 = 1^* > 0,43$
- $4,5 - 2,1 = 2,4^* > 0,43$
- $3,5 - 2,1 = 1,4^* > 0,41$

Les différences significatives entre les moyennes ont été présentées en se servant des lettres. Les moyennes suivies des lettres différentes différaient significativement au niveau de probabilité de 5 %.

Confitures désamérisée	CD NaCl 0,3125 %	CD NaCl 0,625 %	CD NaCl 1,25 %	CD NaCl 2,5 %	CD NaCl 5 %
Moyenne traitement	2,1 (e)	3,5 (d)	4,5 (c)	6,2 (b)	7,4 (a)

Les dégustateurs ont, de façon significative, moyennement préféré la CD NaCl 5 % qu'ils trouvent moins amère. La majorité d'entre eux lui ont attribué la note de 06 et ont été significativement indifférents par rapport à la CD NaCl 2,5 %. Les résultats montrent également qu'ils n'ont pas apprécié les CD NaCl 1,25 %, CD NaCl 0,625 % et CD NaCl 0,3125 qu'ils trouvent très amères.

Nos résultats convergent avec ceux d'un travail antérieur où nous avons également constaté que le sel «

réduit considérablement l'amertume des confitures [8]. Cependant l'analyse hédonique montre que la confiture de pamplemousse est plus amère que celle de bigarade ; les dégustateurs ayant préféré de manière significative la confiture de bigarade CD NaCl 0,625 % à tous les autres échantillons et ont apprécié de la même manière les CD NaCl 0,3125 %, CD NaCl 1,25 % et CD NaCl 2,5 %.

Selon Lagha-Benamrouche et Benkaci [9], les dégustateurs ont privilégié la confiture de pamplemousse CD NaCl à 5 %, qu'ils trouvaient moins amer, suivie de la CD NaCl 2,5%. La majorité a attribué un score de 8 à la CD NaCl 5%. Les résultats montrent également que les dégustateurs étaient indifférents au CD NaCl 1,25 % et qu'ils n'aimaient pas du tout la CD NaCl 0,625 % et la CD NaCl 0,3125 qu'ils trouvaient très amers. Cependant l'analyse hédonique montre que la confiture de pamplemousse est plus amère que celle de bigarade ; les dégustateurs ayant préféré de manière significative la confiture de bigarade CD NaCl 0,625 % à tous les autres échantillons et ont apprécié de la même manière les CD NaCl 0,3125 %, CD NaCl 1,25 % et CD NaCl 2,5 %.

### 3. Conclusion

L'objectif de ce travail a été de valoriser le pamplemousse et la bigarade sous forme de confiture par la désamérisation de leurs écorces. Le sel, la chaleur et l'eau sont considérés comme des éléments indispensables à la désamérisation. Dans le cadre de cette étude le facteur sel a été variable ; dont six taux ont été fixés au cours de cette opération. Ils correspondent aux six pourcentages (0 ; 0,3125 ; 0,625 ; 1,25 ; 2,5 et 5 %) de sel pris en fonction du poids du fruit.

Les résultats de l'analyse sensorielle ont montré que le sel diminue significativement l'amertume des confitures, et que celle-ci disparaissait totalement pour des concentrations de 2,5 % pour la bigarade et 5 % pour le pamplemousse. L'analyse hédonique a montré aussi que la confiture la plus appréciée par les 35 dégustateurs, participants au test, est celle de la bigarade désamérisée avec une concentration en sel de 2,5 %.

La comparaison par paire (test de préférence) des deux confitures a montré que c'est la confiture de

bigarade qui est la plus appréciée pour toutes les concentrations testées.

## Références

- [1] Haineault S., Les vertus thérapeutiques des agrumes : citron, lime, pamplemousse et orange. 2<sup>ème</sup> Ed. Quebecor. France (2007), 152. EAN 9782764017395
- [2] Gautier M., La culture fruitière, Volume 2 : Les productions fruitières. 2<sup>ème</sup> Ed. Coll. Agriculture d'Aujourd'hui, Tec & Doc. Paris (1993), 582.
- [3] Josipura K.J., Hu F.B., Manson J.E., Stampfer M.J., Rimm E.B., Speizer F.E. *et al*, The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease, *Ann. Intern. Med.*, 134 (12) (2001): 1106- 1114. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-12-200106190-00010>
- [4] Susser A., Great Citrus Book: A Guide with Recipes. Ten Speed Press. Berkeley California (1997),158. ISBN-10: 0898158559
- [5] Espiard E., Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Lavoisier Tec & Doc. France (2002), 368. ISBN 10 : 2743005262 ; ISBN 13 : 9782743005269.
- [6] Cheigh CL., Chung EY., Chung MS., Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from *Citrus unshiu* peel using subcritical water, *J. Food Eng.*, 110 (3) (2012): 472–477. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.019>
- [7] Watts B.M, Ylimaki G.L, Jeffery L. and Elias L.G., Méthodes de base Pour l'Evaluation Sensorielle des Aliments, Ed. CRDI. Canada Ottawa (1991), 159. Disponible en ligne. URL : <https://idl-bnc-idrc.dspacedirect.org/bitstream/handle/10625/3774/IDL-3774.pdf?sequence=1> (Consulté le 29/06/2021)
- [8] Lagha-Benamrouche S., Benaissa T., Sadoudi R., Desamerization of Bitter Jam: Biochemical and Sensory Quality, *J. Food Qual.*, 2 (2018): 1-13. <https://doi.org/10.1155/2018/8178059>
- [9] Lagha-Benamrouche S. and Benkaci Z., Influence of desamerization on the quality of a jam based on grapefruit, Iran. *J. Chem. Chem. Eng.*, Doi: [10.30492/IJCCE.2020.117382.3830](https://doi.org/10.30492/IJCCE.2020.117382.3830) (Article in press).
- [10] Rababah T., Al-Mahasneh M.A., Kilani I., Yang Y., Alhamad M.N., Ereifej K. and Aludatt M-H., Effect of jam processing and storage on total phenolics, antioxidant activity, and anthocyanins of different fruits, *J. Sci. Food Agric.*, 91 (6) (2011):1096–1102. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4289>
- [11] Stone H. and Sidel J., Sensory evaluation practices. A volume in Food and technology. 3<sup>ème</sup> Ed. Academic press. Redwood City (2004), 408. ISBN: 9780126726909; eBook ISBN: 9780080474359
- [12] Jones LV., David R., Peryam L. and Thurstone L., Development of scale for measuring soldier's food preferences, *J. Food Sci.*, 20 (5) (1955): 512-520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1955.tb16862.x>



Annexe : Distribution de F à un seuil de signification de 5 % [7]

$\nu_1 \backslash \nu_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	161-45	199-60	215-71	224-58	230-16	233-99	236-77	238-88	240-54
2	18-513	19-000	19-164	19-247	19-296	19-330	19-353	19-371	19-385
3	10-128	9-5521	9-2766	9-1172	9-0135	8-9406	8-8868	8-8452	8-8123
4	7-7086	6-9443	6-5914	6-3883	6-2560	6-1631	6-0942	6-0410	5-9988
5	6-0079	5-7881	5-4095	5-1922	5-0503	4-9503	4-8759	4-8183	4-7725
6	5-9874	5-1433	4-7571	4-5337	4-3874	4-2839	4-2068	4-1468	4-0990
7	5-5914	4-7374	4-3488	4-1203	3-9715	3-8660	3-7870	3-7257	3-6767
8	5-3177	4-4590	4-0662	3-8378	3-6876	3-5806	3-5005	3-4381	3-3881
9	5-1174	4-2565	3-8626	3-6331	3-4817	3-3738	3-2927	3-2296	3-1789
10	4-9646	4-1028	3-7083	3-4780	3-3258	3-2172	3-1355	3-0717	3-0204
11	4-8443	3-9823	3-5874	3-3567	3-2039	3-0946	3-0123	2-9480	2-8962
12	4-7472	3-8853	3-4903	3-2592	3-1059	2-9961	2-9134	2-8486	2-7964
13	4-6672	3-8056	3-4105	3-1791	3-0254	2-9153	2-8321	2-7669	2-7144
14	4-6001	3-7389	3-3439	3-1122	2-9582	2-8477	2-7642	2-6987	2-6458
15	4-5431	3-6823	3-2874	3-0556	2-9013	2-7905	2-7066	2-6408	2-5876
16	4-4940	3-6337	3-2389	3-0069	2-8524	2-7413	2-6572	2-5911	2-5377
17	4-4513	3-5915	3-1988	2-9647	2-8100	2-6987	2-6143	2-5480	2-4943
18	4-4139	3-5546	3-1599	2-9277	2-7729	2-6613	2-5767	2-5102	2-4563
19	4-3808	3-5219	3-1274	2-8961	2-7401	2-6283	2-5435	2-4768	2-4227
20	4-3513	3-4928	3-0984	2-8661	2-7109	2-5990	2-5140	2-4471	2-3928
21	4-3248	3-4668	3-0725	2-8401	2-6848	2-5727	2-4876	2-4205	2-3661
22	4-3009	3-4434	3-0491	2-8167	2-6613	2-5491	2-4638	2-3965	2-3419
23	4-2793	3-4221	3-0280	2-7955	2-6400	2-5277	2-4422	2-3748	2-3201
24	4-2597	3-4028	3-0088	2-7763	2-6207	2-5082	2-4226	2-3551	2-3002
25	4-2417	3-3862	2-9912	2-7587	2-6030	2-4904	2-4047	2-3371	2-2821
26	4-2262	3-3690	2-9761	2-7426	2-5808	2-4741	2-3883	2-3205	2-2655
27	4-2100	3-3541	2-9604	2-7278	2-5719	2-4591	2-3732	2-3053	2-2501
28	4-1960	3-3404	2-9467	2-7141	2-5581	2-4463	2-3593	2-2913	2-2360
29	4-1830	3-3277	2-9340	2-7014	2-5464	2-4324	2-3463	2-2782	2-2229
30	4-1709	3-3158	2-9223	2-6896	2-5336	2-4205	2-3343	2-2662	2-2107
40	4-0848	3-2317	2-8387	2-6060	2-4495	2-3359	2-2490	2-1802	2-1240
60	4-0012	3-1504	2-7581	2-5252	2-3683	2-2540	2-1665	2-0970	2-0401
120	3-9201	3-0718	2-6802	2-4472	2-2900	2-1760	2-0867	2-0164	1-9588
$\infty$	3-8416	2-9957	2-6049	2-3719	2-2141	2-0986	2-0096	1-9384	1-8789

Note : Dans ce tableau, il faut remplacer le point décimal par la virgule décimale.  
Ce tableau donne les valeurs de  $F$  pour lesquelles  $I_F(\nu_1, \nu_2) = 0,05$ .

Soumis le : 11/05/2020

Forme révisée accepté le : 09/02/2021

Auteur Corespondant: [adjlanenouredine@hotmail.com](mailto:adjlanenouredine@hotmail.com)



**Revue  
Nature et Technologie**

<http://www.univ-chlef.dz/revuenatec>

ISSN : 1112-9778 – E-ISSN : 2437-0312

## Prévalence et répartition de la bactérie *Paenibacillus larvae* (Agent causal de la Loque américaine) au niveau de quelques ruchers de la région centre d'Algérie

ADJLANE Nouredine <sup>a,\*</sup> et HADDAD Nizar <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Département d'Agronomie, Université M'hamed Bougara, Avenue de l'indépendance, Boumerdes, 35 000 Algérie.

Laboratoire de Bioinformatique, Microbiologie Appliquée et Biomolécules (BMAB), Université M'Hamed Bougara de Boumerdès

<sup>b</sup> National Agricultural Research Center, P.O. Box 639-Baqa' 19381, Jordan.

### Résumé

L'abeille constitue un élément indispensable de l'équilibre environnemental en tant que pollinisateur de très nombreuses espèces. La Loque américaine constitue une pathologie grave qui menace les colonies d'abeilles. Elle est considérée comme étant la maladie la plus néfaste du couvain de l'abeille domestique *Apis mellifera*. Les spores représentent le stade infectieux. La pathologie est causée par la bactérie *Paenibacillus larvae*. L'objectif de ce travail est l'étude de la prévalence de cette pathologie dans quelques régions du centre d'Algérie, en utilisant des méthodes de diagnostic microbiologiques et moléculaires. La recherche d'une possible influence de cette pathologie sur les mortalités des ruches est l'un des objectifs recherchés de ce travail. Un échantillonnage a été effectué sur 6 wilayas à la fin du 2019, 100 prélèvements ont été réalisés dans l'ensemble des régions étudiées sur 24 ruchers dont 4 ruchers par région. Une méthode de diagnostic microbiologique et une autre moléculaire par PCR<sup>1</sup> ont été utilisés pour la détermination de la contamination des abeilles par la bactérie. L'analyse des résultats obtenus montre que la bactérie est présente dans les cinq zones étudiées, mais les populations d'abeilles sont infestées à divers niveaux. Nombreux sont les facteurs qui favorisent la dissémination de la pathologie tels que les mauvaises pratiques apicoles, la forte densité des colonies d'abeilles, la vente des essaims et la transhumance. Le caractère hautement pathogène de cette maladie et l'incapacité de la dépister précocement sont en partie responsables de sa large diffusion.

Mots-clés : *Paenibacillus larvae* ; Abeille mellifère ; Prévalence ; PCR ; Symptômes, Mortalités.

### *Prevalence and distribution of the bacterium Paenibacillus larvae (causal agent of American foulbrood) at the level of some beehives of the central region of Algeria*

### Abstract

The honey bee constitutes an essential element of the environmental balance in the world as a pollinator of very many species. American foulbrood is a serious disease that threatens local bee colonies. It is considered to be the most harmful disease of the honey bee *Apis mellifera*. Spores represent the infectious stage. The pathology is caused by the bacterium *P. larvae*. The objective of this work is to study the prevalence of this pathology in some regions of central Algeria, using microbiological and molecular diagnostic methods. The research of a possible influence of this pathology on the hives mortalities is one of the sought objectives of this work. A sampling was carried out on 6 wilayas at the end of 2019, 100 samples were taken from all the regions studied, but the end of 2019 from 24 apiaries including 4 apiaries by region. A microbiological and a molecular diagnostic method by PCR were used to determine the contamination of bees by the bacterium. The analysis of the results obtained shows that the bacterium *Paenibacillus larvae* are present in the five areas studied. But bee populations are infested at various levels. Many factors favor the spread of the disease, such as poor beekeeping practices, the high density of honey bee colonies, the sale of swarms and transhumance. The highly pathogenic nature of this disease and the inability to detect it early are partly responsible for its wide spread.

Keywords: *Paenibacillus larvae*; Honey bee; Prevalence; PCR; Symptoms; Mortalities.

<sup>1</sup> PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction en chaîne par polymérase). Technique permettant d'amplifier spécifiquement un ADN d'intérêt après plusieurs cycles de réactions biochimiques.



Ceci est un document en libre accès selon les termes de [Creative Commons Attribution License CC-BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), ce qui permet de le partager, copier, reproduire, distribuer, communiquer, réutiliser ou de l'adapter avec l'obligation de créditer son auteur.

## 1. Introduction

La Loque américaine (AFB) est une maladie infectieuse du stade larvaire de l'abeille *Apis mellifera*, et est présente dans le monde entier où de telles abeilles sont gardées [1]. La Loque américaine est causée par la bactérie gram-positif *P. larvae*. Les larves de cette bactérie ont une capacité de propagation importante. Elle peut produire des milliards de spores dans chaque larve infectée, et peut survivre pendant de nombreuses années dans les écailles, les produits de la ruche et les équipements utilisés par les apiculteurs. De plus, cette bactérie est très résistante à la chaleur et aux produits chimiques [2]. Les individus malades brunissent, et la masse résultante devient gluante, enfin il y a une écaille foncée et dure sur le côté de la cellule [3]. Le couvain malade agit comme une source de spores infectieuses qui peuvent se propager dans tout un rucher et le tuer s'il n'est pas contrôlé ; pour ces raisons, la Loque est considérée comme l'une des rares maladies des abeilles capables de tuer des colonies entières [4]. L'infection des colonies continue d'être un problème et est le plus souvent causée par l'utilisation d'équipements contaminés, le déplacement des rayons de couvain infectés dans les colonies, la nourriture avec du miel contaminé. La Loque a un grave impact économique négatif sur l'industrie apicole et indirectement sur l'agriculture [5].

L'inspection des maladies des abeilles est un élément important de l'apiculture. Les apiculteurs doivent pouvoir reconnaître les maladies des abeilles selon des signes manifestement cliniques [6,7]. Les indicateurs les plus importants sont le couvain et les larves en bonne santé [8]. Une larve saine a un aspect blanc nacré scintillant. Elle se développe à la base de la cellule en forme de «C » et continue de croître en position verticale jusqu'au remplissage de la cellule [9]. Une fois infecté, la couleur de la larve change en brun crémeux puis en brun foncé [10]. Traditionnellement, les larves brun foncé ressemblant à la colle. Les larves décomposées peuvent former un fil avec le test de l'allumette, plongée et retirée dans la cellule douteuse ; ensuite la caractéristique filante disparaît et la larve devient une écaille adhérente aux parois de la cellule, ces résultats représentent les symptômes cliniques les plus évidents de la Loque américaine. C'est envisageant un système d'alerte de première ligne contre la maladie dans un domaine reconnu par les apiculteurs

[11].

Il existe deux principaux agents (facteurs) de transmission qui propagent la maladie : Les abeilles et l'apiculteur. La maladie se propage lorsque des spores sont transportées sur des abeilles dérivantes, des ruches, sur les vêtements de l'apiculteur et sur le pollen ou miel contaminés [12]. La forte densité d'individus au sein de la colonie, le contact physique étroit entre eux (par le contact causuel et la communication) et l'échange trophallactique des aliments et des substances glandulaires offrent tous des possibilités nombreuses de transmission d'agents pathogènes [13]. Par comportement de nettoyage des cellules, les abeilles ouvrières sont contaminées lorsqu'elles éliminent les larves séchées, une voie d'infection importante pour propager les spores infectieuses dans la colonie [14].

En Algérie, peu d'études ont été faites sur la Loque américaine en utilisant les méthodes de détections microscopiques, biochimiques et microbiologiques. L'objectif de ce travail est de déterminer la prévalence de la pathologie pendant la saison apicole 2019-2020 dans quelques ruchers situés dans la région centre d'Algérie en procédant à l'utilisation des méthodes microbiologiques et moléculaires.

## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1. Collection d'échantillons.

L'échantillonnage a été effectué dans 5 régions, Blida, Boumerdès, Alger, Tipaza et Bouira, au nord centre de l'Algérie, sur des colonies d'abeilles de la race *Apis mellifera intermissa*. 100 prélèvements ont été réalisés dans l'ensemble des régions étudiées durant la fin de l'année 2019 sur 20 ruchers, dont quatre ruchers par région.

### 2.2. Prélèvement des échantillons d'abeilles

Le prélèvement des ouvrières destinées à l'expérimentation a été réalisé se fait au niveau des cadres à couvain. A l'aide d'une brosse et d'un geste rapide les abeilles sont directement collectées dans une boîte de conservation laquelle est aussitôt fermée.

Pendant le transport, les abeilles adultes ont été conservées et plongées dans des boîtes numérotées contenant de l'éthanol 90°. Ce dernier est considéré comme un moyen de conservation des abeilles. Quand

---

le délai entre le prélèvement et l'utilisation des abeilles pour l'analyse est grand, il a été procédé à la congélation des abeilles à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. Méthode de diagnostic microbiologique de l'agent causal

La méthode de Lundstrom et Fries [15] est utilisée dans la détection de la bactérie. Écraser soigneusement les intestins d'abeilles avec un mortier, après filtration, on place l'échantillon dans un tube à essai et on va ajouter 20 mL de l'eau physiologique. Le mélange obtenu est centrifugé pendant 10 minutes. Le culot est récupéré et mélangé avec 12 mL de NaCl stérile ( $13\text{ g.L}^{-1}$ ), l'échantillon est incubé pendant 10 minutes à  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  et 10  $\mu\text{L}$  de la suspension sont inoculés sur les plaques MYPGP- agar. La lecture des résultats s'effectuera après avoir incubé ce dernier échantillon dans pendant 7 jours à  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  et à 5 % de  $\text{CO}_2$ . Sur la gélose MYPGP, les colonies de la bactérie *P. larvae* sont petites, régulières, en général rugueuses, plates, blanchâtres ou beiges.

### 2.4. Méthode de diagnostic génétique de la Loque américaine

#### 2.4.1. Enrichissement de *P. larvae*.

Les colonies bactériennes ont été collectées avec une boucle d'inoculation stérile et dispersées dans cinq mL de bouillon MYPGP. La suspension a été incubée à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures avec agitation continue à  $170\text{ tr.min}^{-1}$  [16].

#### 2.4.2. Extraction d'ADN du bouillon MYPGP

Les colonies bactériennes enrichies en bouillon MYPGP ont été récoltées dans une micro-centrifugeuse tube par centrifugation (Scientific, USA) à  $14\ 000\text{ tr.min}^{-1}$  pendant trois minutes. Les pellets collectés ont été remis en suspension dans 300  $\mu\text{L}$  de solution tampon CTAB (2 % (poids/vol) CTAB, 1,4 M NaCl, 1 % (wt/vol) PVP, 0,02 M EDTA et 0,1 M Tris-HCL. (pH ajusté à 8,0) et incubé dans bain-marie à  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 30 min sous agitation continue, puis le lysat bactérien a été incubé avec 30 rpm d'enzyme RNase 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 30 min. un volume de

phénol / chloroforme / alcool isoamylique (ratio 25 :24 :1) a été ajouté, mélangé et 25 microcentrifugé à  $14\ 000\text{ tr.min}^{-1}$  pendant 5 min. Le surnageant a ensuite été transféré dans un nouveau tube ; Ensuite, un volume égal de chloroforme / alcool isoamylique (24 :1 v/v) a été ajouté, mélangé et micro-centrifugé à  $14\ 000\text{ tr.min}^{-1}$  pendant 5 minutes. Le surnageant était transféré à nouveau dans un nouveau tube, 0,6 volume d'isopropanol ont été ajoutés et mélangés doucement et ensuite incubés à  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 30 min ou toute une nuit à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à précipitation de l'ADN. Puis le tube a été centrifugé à  $14\ 000\text{ tr.min}^{-1}$  pendant 15 min, le surnageant a été jeté et le l'ADN précipité a été lavé avec 1 mL d'éthanol à 70 %, puis centrifugé à  $14\ 000$  pendant 5 minutes. Le surnageant a été jeté et l'ADN a été séché à température ambiante après avoir inversé le tube sur un papier filtre pour permettre à tout le liquide de sécher. Enfin, le culot a été remis en suspension dans du tampon TE de 50  $\mu\text{L}$  (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) et EDTA 1 mM (pH 8,0)), et conservé à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

#### 2.4.3. Pureté de l'ADN

La qualité de l'ADN a été testée en exécutant 10  $\mu\text{L}$  de solution d'ADN mélangée à 2  $\mu\text{L}$  de chargement colorant (Promega, USA) dans un gel d'agarose à 0,7 % à 80 volts pendant 30 min, puis photographié (Alphalimager, États-Unis).

#### 2.4.4. Amplification PCR

La technique d'amplification a été directement utilisée pour détecter la présence ou l'absence de *P. larvae* dans les échantillons d'abeilles.

Les amorces utilisées pour amplifier deux régions spécifiques de la bactérie *P. larvae* sont : 5'-ACAAACTGGACCCGATCTAC-3' (KAT1) et 5'-CCGCCTTCTTCATATCTCCC-3' (Kat 2) [3].

### 2.5. Techniques employées pour l'analyse statistique des résultats

Les données obtenues ont été analysées avec le logiciel<sup>2</sup> Statistica® version 10 suivant le processus de l'analyse de la variance (ANOVA). La comparaison des moyennes a été faite par le test de

<sup>2</sup><http://www.statsoft.fr/> / <https://www.tibco.com/products/data-science>

Newman – Keuls au seuil de 5 %.

### 3. Résultats

La prévalence de la Loque américaine en 2019 dans la région centre de l'Algérie est représentée dans la figure 1. Il existe une différence significative entre les

taux de contamination de la bactérie des régions étudiées ( $p < 0,05$ ). La région de Tipaza enregistre la fréquence la plus élevée avec un taux de contamination de 32 %, suivie par celle de Boumerdes avec 19 %. Dans les autres régions les fréquences d'occurrence sont plus basses comme à Blida (14 %), Alger (11 %) et Bouira (5 %).

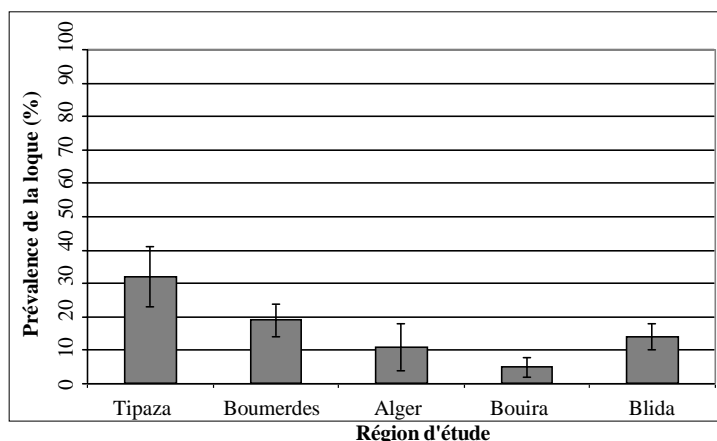


Figure 1 : Prévalences de la Loque américaine dans les zones étudiées

En conditions réelles, la détection de la Loque américaine est basée sur l'apparence du couvain contenant des larves malades dont l'aspect est très

particulier. Pour l'ensemble des ruches infestées, moins de 10 % des colonies sont caractérisés par la présence des symptômes de la maladie (Figure 2).

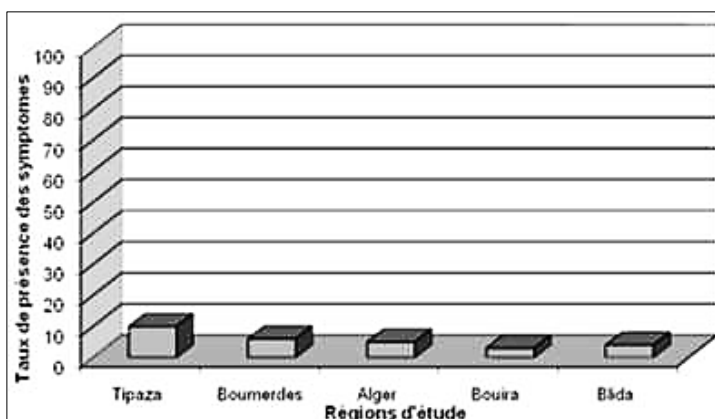


Figure 2 : Fréquences de l'apparition des symptômes de la Loque américaine dans les colonies infestées par la bactérie *P. larvae*

Parmi les symptômes typiques de la Loque américaine, un couvain irrégulier, des opercules perforés, des écailles, une masse brun clair dans la cellule formant un fil (Figure 3). On note d'ailleurs une

corrélation entre le pourcentage de contamination des ruches par la bactérie et la présence des signes de la pathologie. ( $R=0,96, p < 0,001$ ) (Figure 4)

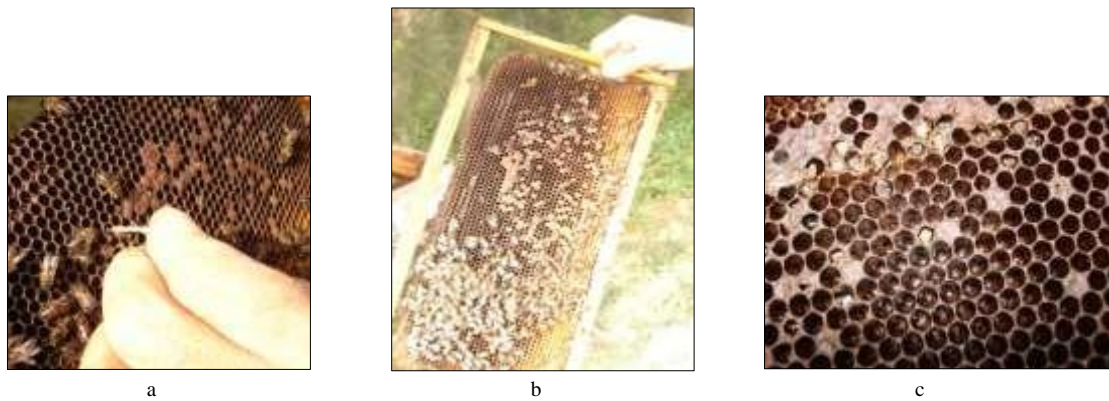
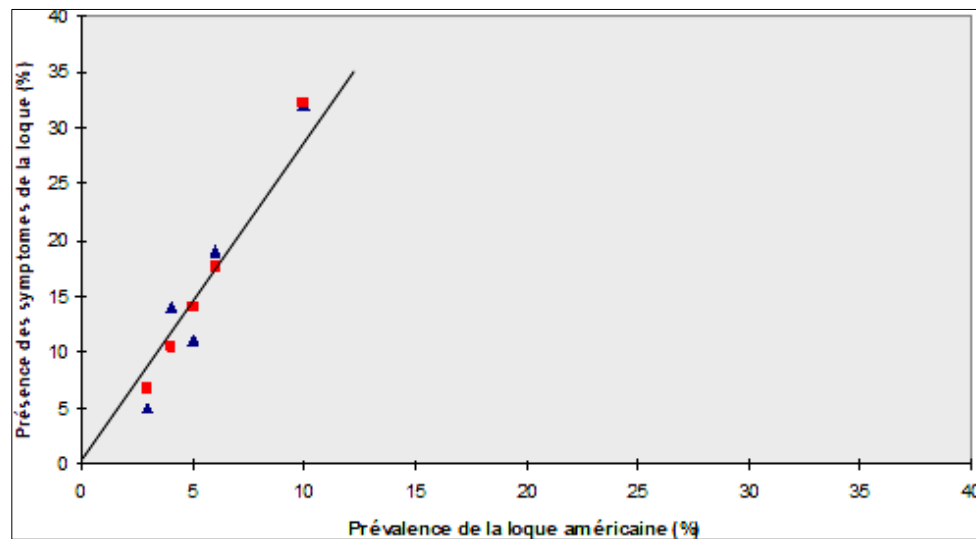


Figure 03 : Symptômes de la Loque américaine



a : Le test de l'allumette pour la détection de la Loque américaine (le contenu des cellules atteintes est filandreux et de consistance visqueuse) ;  
 b, c : Un couvain en mosaïque avec des opercules perforés et des écailles

Figure 4 : régression linéaire montrant la corrélation entre le taux de prévalence de la maladie et la présence de symptômes de la Loque. ( $R=0,96$ ,  $p < 0,001$ )

L'enquête réalisée en parallèle avec les prélèvements révèle que le taux de mortalité ne dépasse pas 10 % pour la majorité des ruchers visités. Le taux de mortalité le plus élevé est enregistré dans la région de Blida où les apiculteurs signalent une perte de 12 % en moyenne (Figure 5). Aucune corrélation n'existe entre les mortalités enregistrées et la présence de la Loque américaine ( $R=0,39$  ;  $p > 0,05$ ) (Figure 6).



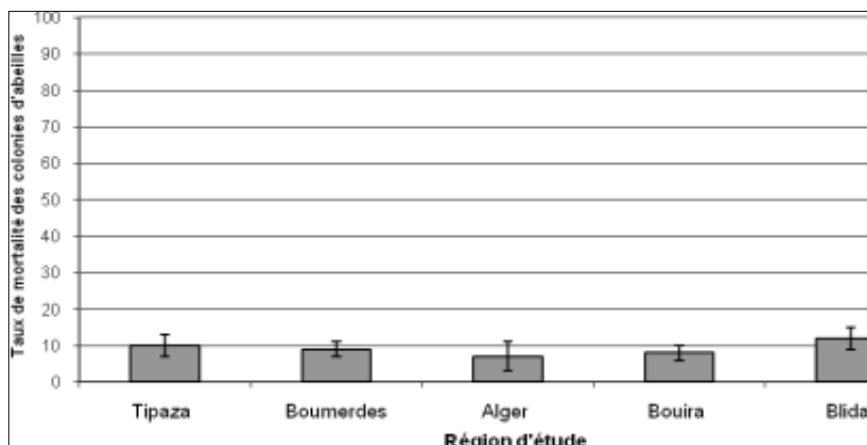


Figure 5 : Taux de mortalités enregistrés dans les ruchers étudiés pendant l'hiver 2019-2020.

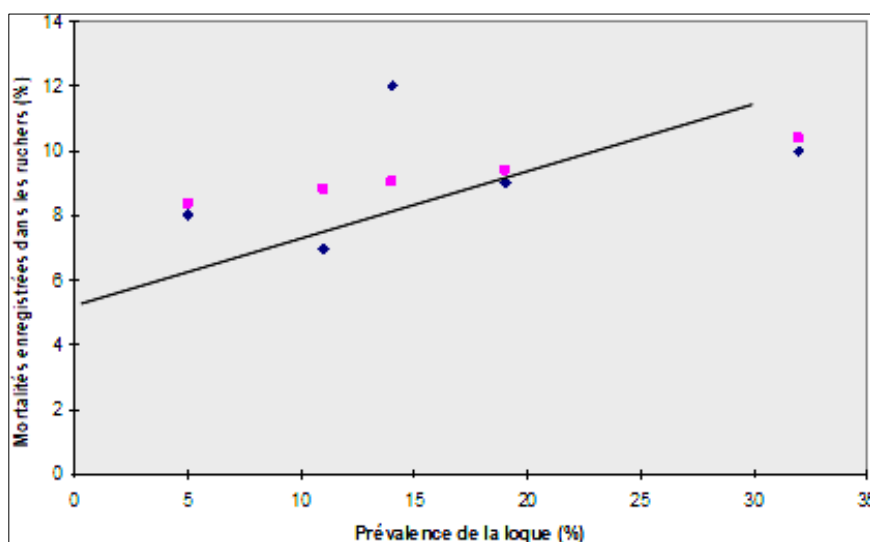


Figure 6 : régression linéaire montrant la corrélation entre le taux de prévalence de la maladie et les mortalités enregistrées dans les ruchers

#### 4. Discussion

La Loque américaine est une pathologie grave qui menace les colonies d'abeilles locales. Elle est considérée comme la maladie la plus néfaste du couvain de l'abeille domestique *A. mellifera*. Les résultats obtenus confirment la présence de cette pathologie dans les ruchers algériens. Cette recherche est la première confirmation au niveau national par l'utilisation des méthodes moléculaires. L'analyse des résultats obtenus montre que la bactérie *Paenibacillus larvae* est présente dans les cinq zones étudiées. Mais les populations d'abeilles sont infestées à divers niveaux. En général, la Loque américaine est décelée à la fin de l'hiver et au printemps. L'échantillonnage dans le cas de la présente

étude, a été effectué en hiver. Par ailleurs, les manipulations effectuées par l'apiculteur sont considérées comme un important facteur dans la propagation de la pathologie. Les mauvaises pratiques apicoles sont elles-mêmes favorables à l'apparition et à la diffusion de la Loque. L'échange des cadres de couvain contenant des restes de larves malades est la voie de diffusion de la maladie la plus commune [22].

Il faut rappeler qu'il existe d'autres voies de dispersion de la maladie tels que la vente des essaims qui peuvent être porteurs de spores et le déplacement des colonies d'abeilles [23]. En Algérie, les apiculteurs déplacent leurs ruches plusieurs fois par an dans différents endroits à la recherche de ressources nectarifères. Ces mouvements peuvent contribuer à la

propagation de la maladie. Des ruches contaminées peuvent introduire la maladie dans un nouvel endroit. A signalé que la transhumance des ruches en Algérie se fait sans aucune autorisation sanitaire.

Le mode de transmission entre les hôtes d'un agent pathogène est important pour la détermination de la virulence du pathogène et comme facteur clé du taux de transmission [24]. Les différents modes de transmission des agents pathogènes peuvent être divisés en deux catégories : horizontal et verticale. La transmission horizontale fait référence à la transmission parasitaire entre individus de la même génération, la transmission horizontale des spores entre les colonies est disponible [25] ; en référence verticale à celle du parent à la progéniture [26]. Chez les abeilles, la transmission de l'agent pathogène se produit horizontalement par dérive ou vol, et verticalement par essaimage. Le mode de transmission horizontal se produit à travers plusieurs itinéraires, par exemple en dérivant une abeille infectée de sa propre colonie à une autre [27], ou les contacts entre des individus ou avec matériel infectieux pendant le vol (est une activité dans laquelle les abeilles butineuses d'une colonie envahissent une autre colonie pour voler du miel : pillage). De Graaf *et al.* [17] rapportent à travers les résultats de leurs essais que la présence de *P. larvae* dans une ruche n'est pas systématiquement accompagnée de symptômes cliniques. Une colonie peut présenter de grandes quantités de spores par abeille adulte sans présenter de signes cliniques de la Loque américaine [18]. Lorsque des symptômes cliniques de la maladie apparaissent dans les colonies infectées, en l'absence de traitement, celles-ci succomberont très probablement à cette maladie [19]. Dans des colonies ne présentant pas de symptôme clinique de la maladie, des spores du pathogène peuvent être détectées dans des échantillons du couvain [20], ou dans le miel [21].

Les signes cliniques de la Loque américaine dépendent aussi du niveau de la virulence de la souche de la bactérie, de la concentration des spores dans les colonies et de la force de la ruche et sa résistance éventuelle à la Loque américaine [24].

A l'échelle mondiale, plusieurs travaux de recherche ont porté sur la répartition de la Loque au sein des colonies d'abeilles. En Suède, une étude a mis en évidence une prévalence de 70 % des abeilles contaminées par la Loque [15]. En Argentine, une étude

rapporte que 38 % des échantillons du miel des apiculteurs sont contaminés par la bactérie *P. larvae* [28]. En Argentine, 50 % des échantillons de miel sont contaminés par la bactérie [29]. Selon une étude faite en Pologne sur 242 échantillons du miel analysés en 2006, 23 % sont caractérisés par la présence de la bactérie [30]. En République Tchèque [31] rapportent un taux de 12 % des colonies contaminés par la bactérie. En 2010, les résultats d'une étude [32] ont rapportés un taux de 17 et 13 % d'infestation par la bactérie dans un échantillonnage qui a été effectué en Iran dans deux mois différents (Mai et Juin). En Iraq, on signale une faible prévalence de la pathologie [33]. Le taux de présence de la bactérie est de 2 %, la Loque européenne est la pathologie qui est présente en pourcentage très élevé (plus de 80 %).

Dans une étude faite en Ouganda, les chercheurs signalent la faible présence de cette pathologie. Les adaptations comportementales telles que la fuite et l'essaimage parmi les races d'abeilles africaines peuvent également expliquer leurs faibles niveaux d'infestation parasitaire. Deux races d'abeilles mellifères, *Apis mellifera scutellata* et *Apis mellifera adonsonii* sont caractérisés par un caractère comportemental pourrait entraîner une désinfection des colonies d'abeilles mellifères officiellement infectées par la bactérie [34]. L'étude de Morán (2011) [35] au Chili a analysé environ 1 300 échantillons de miel collectés dans les cadres de miel frais sur le terrain entre 2004 et 2009. Les résultats ont montré une prévalence estimée de 4 % des spores de *P. larvae* dans les échantillons de miel étudiés. Les résultats ont montré des effets similaires de *Paenibacillus* sur le taux de survie et les profils d'expression du gène codant pour des peptides antimicrobiens chez deux espèces d'abeilles (*mellifera* et *cerana*) lorsque les larves d'abeilles sont infectées par des spores à la concentration létale médiane (CL50) [36]. Les résultats de Stephan *et al.* (2020) [37] rapportent que la mortalité du couvain causée par la Loque américaine a entraîné une diminution progressive du nombre d'abeilles ouvrières adultes, entraînant finalement la colonie dans une spirale négative mortelle à laquelle elle ne pouvait pas échapper. Des chercheurs suggèrent fortement la nécessité d'appliquer des méthodes de culture améliorées ou une détection et quantification moléculaire pour une estimation plus fiable du risque de la Loque américaine afin de lutter

efficacement contre cette peste des abeilles [38]. Les résultats de Bassi *et al.* (2018) [39] ont montré que les niveaux de spores de *P. larvae* dans les débris de ruche peuvent être un outil utile pour l'évaluation des risques de la Loque américaine. L'utilisation de la PCR avec combiné avec d'autres outils moléculaires, sera une approche utile pour identifier les bactéries de *Paenibacillus* dans les échantillons de pollen et aidera à contrôler cette propagation du pathogène [40].

## 5. Conclusion

Les résultats de notre étude montrent clairement la présence et la forte prévalence de la Loque américaine dans les ruchers algériens, cette présence est accompagnée le plus souvent avec symptôme. Plusieurs facteurs peuvent éventuellement expliquer cette grande variation dans la distribution de la maladie tels que le facteur climatique, et surtout le rôle de l'apiculteur dans la dissémination de la pathologie. Selon la gravité de la situation, les colonies d'abeilles affectées par la Loque américaine seront détruites ou traitées au moyen d'interventions apicoles particulières. L'apiculteur ou le vétérinaire doit vérifier au moins deux fois par an l'absence de symptômes de la maladie sur tous les cadres du couvain au début et à la fin de la période apicole. Lorsqu'il y a un transfert d'un cadre du couvain d'une colonie à une autre, il faut vérifier le bon état sanitaire des deux ruches. Il faut appliquer la mise en quarantaine dans le rucher atteint par la maladie.

## Références

- [1] Adjlane N. et Kechi H. S., la Loque américaine des abeilles mellifères : symptômes, contrôle et diagnostic, *Pratique vétérinaire*, 12 (2011) : 23-27.
- [2] Spivak M.S. & Reuter G.S., Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior, *Apidologie*, 32 (2001): 555– 565. <https://doi.org/10.1051/apido:2001103>
- [3] Allipi A. M., Reynaldi F.J., Lopez A.C, De Giusti M.R. & Aguilar O.M., Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae* and incidence of American foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires province, *J. Apic. Res.*, (43) (2004): 135-143. <https://doi.org/10.1080/00218839.2004.11101124>
- [4] Ricchiuti L., Rossi F., Del Matto I., Iannitto G., Del Riccio A.L., Petrone D. & Cammà C., A study in the Abruzzo region on the presence of *Paenibacillus larvae* spores in honeys indicated underestimation of American foulbrood prevalence in Italy, *Journal of Apicultural Research*, 58 (3) (2019): 416-419. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1541651>
- [5] Adjlane, N. & Haddad, N., Effect of some honey bee diseases on seasonal mortality of *Apis mellifera intermissa* in Algeria apiaries. In: *Proceedings of the Zoological Society*. Springer India, (2018), 83-87. <https://doi.org/10.1007/s12595-016-0188-5>
- [6] Adjlane N, Doumandji S.E. & Haddad N., Situation de l'apiculture en Algérie : facteurs menaçant la survie des colonies d'abeilles locales *Apis mellifera intermissa*, *Cah. Agric.*, 21 (2012) : 235- 41. <https://doi.org/10.1684/agr.2012.0566>
- [7] Haddad N. & Shehada S., "Honey bee brood disease", *NCARE*, (2001).
- [8] Haddad N.J. & Aladwan O., "American foulbrood", *Jordan agricultural engineering association*, 83 (2007): 58-59.
- [9] Otten, C., A general overview on AFB and EFB pathogen, way of infection, multiplication, Clinical symptoms and outbreak, *Agricultural*, 54 (2003): 15-25. Disponible en ligne : <http://www.fiitea.org/foundation/files/2003/Otten.pdf>. Accédé le 05/05/2020
- [10] Ashiralieva A. & Genersch E., Reclassification, genotypes, and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honey bees - a review, *Apidologie*, 37 (2006): 411–420. <https://doi.org/10.1051/apido:2006028>
- [11] De Graaf D.C., Vandekerckhove D., Dobbelaire W., Peeters J.E. & Jacobs F. J., Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey, *Apidologie*, 32 (2001): 587-599. <https://doi.org/10.1051/apido:2001146>
- [12] Hansen H. & Brodsgaard C.J., American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control, *Bee World*, 80 (1999): 5–23. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0005772X.1999.11099415>
- [13] Fries I. & Camazine S., Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology, *Apidologie* 32 (2001): 199–214. <https://doi.org/10.1051/apido:2001122>
- [14] Basualdo M, E. Figini, J. Torres, A. Tabera, Bedascarrasbure, C. & Libonatti, E., Short communication. Control of American foulbrood disease in Argentine commercial apiaries through the use of queens selected for hygienic behaviour, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 23 (2008): 15-28. Disponible en ligne : <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=ES2008000980>. Accédé le 28/04/2020
- [15] Lindstrom A. & Fries I., Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) spores in honey bee (*Apis mellifera*) colonies, *J. Apicult. Res.*, 44 (2) (2005): 82-86. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101154>
- [16] Lauro F. M., Favaretto M., Covolo L., Rassu M. & Bertoloni G., Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol, *International Journal of Food Microbiology*, 81 (2003): 85-96. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00257-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00257-x)
- [17] De Graaf D. C., Alippi A. M., Brow, M., Evans J. D., Feldlaufer M., Gregorc A. & Tomkies V., Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols, *Letters in applied microbiology*, 43 (6) (2006): 583-590. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02057.x>
- [18] Lindstrom A., Korpela S. & Fries I., Horizontal transmission of *Paenibacillus larvae* spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing, *Apidologie*, (39) (2008): 515-522. <https://doi.org/10.1051/apido:2008032>
- [19] Genersch E., Ashiralieva A. & Fries I., Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honey bees, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (11) (2005): 7551-7555. <https://doi.org/10.1128/aem.71.11.7551-7555.2005>
- [20] Hornitzky M.A.Z., The detection of *Bacillus larvae* (American foulbrood) in adult honey bees, *Australas. Beekeep.* 90 (1988) : 11–12.
- [21] Antunez K., D'alexandro B., Piccini C., Corbella E. & Zunino P., *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey, *Journal of Invertebrate Pathology*, 86 (2004): 56–58. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.03.011>

- [22] Shimanuki H. & Knox D.A., Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey, *Am. Bee J*, 128 (1988): 353-354.
- [23] Pankiw F. & Corner J., The transmission of American foulbrood by package bees, *J. Apicult. Res.*, 5 (1966) : 99-101. <https://doi.org/10.1080/00218839.1966.11100141>
- [24] Fries I, Lindström A. & Korpela S.; Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*), *Veterinary microbiology*, 114 (3-4) (2006): 269-274. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.068>
- [25] Human H., Pirk C. W. W., Crewe, R. M., & Diemann, V., The honey bee disease American foulbrood - an African perspective, *African Entomology*, 19 (3) (2011): 551-557. <https://doi.org/10.4001/003.019.0301>
- [26] Dingman D. W., Honey bees and American Foulbrood, *Plant Science*, 70 (2009): 47-49.
- [27] Miyagi T., Peng C.Y.S., Chuang R.Y., Mussen E.C., Spivak M.S. & Doi R.H., Verification of Oxytetracycline-resistant American Foulbrood Pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States, *J. Invertebr. Pathol.*, 75 (1999) : 95-96. <https://doi.org/10.1006/jjpa.1999.4888>
- [28] Iurlina M.O., Saiz A.I., Fuselli S.R. & Fritz R., Prevalence of *Bacillus spp.* in different food products collected in Argentina., *LWT - Food Science and Technology*, 39 (2006): 105- 110. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.01.006>
- [29] Basualdo M., Figini E., Torres J., Tabera A., Libonatti C. & Bedascarrasbure E., Control of American foulbrood disease in Argentine commercial apiaries through the use of queens selected for hygienic behavior, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6 (2) (2008): 236-240. Disponible en ligne : [http://www.inia.es/gcontrec/pub/236-240\\_SC\\_Control\\_1212051796421.pdf](http://www.inia.es/gcontrec/pub/236-240_SC_Control_1212051796421.pdf). Accédé le 13/01/2021
- [30] Pohorecka K. & Bober A., Occurrence of *Paenibacillus larvae* spores in Honey samples domestic apiaries, *Journal of Apicultural Science*, 52 (2) (2008) : 105-111. Disponible sur URL : <http://www.jas.org.pl:81/Issue/25>. Accédé le 12/04/2020
- [31] Ryba S., Titera D., Haklova M., Stopka P., A PCR method of detecting American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris, *Veterinary Microbiology*, 139 (2009): 193–196. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.05.009>
- [32] Yuesefkhani M. & Lotfi A., Incidence of Foulbrood in Honey Bee of Eastern Azerbaijan Province, Northwest of Iran, *Academic Journal of Entomology*, 3 (2010): 37-38. Disponible en ligne : [https://www.idosi.org/aje/3\(1\)10/7.pdf](https://www.idosi.org/aje/3(1)10/7.pdf). Accédé le 08/04/2020
- [33] Hind Suhail A. & May Ibraheem Y., Effects of diseases and pests on honey bee (*Apis mellifera*) in different parts in Baghdad city, Iraq, *Plant Archives*, 20 (1) (2020) 220-223. Disponible en ligne. [http://www.plantarchives.org/SPECIAL%20ISSUE%2020-1/44\\_220-223\\_.pdf](http://www.plantarchives.org/SPECIAL%20ISSUE%2020-1/44_220-223_.pdf). Accédé le
- [34] Chemurot M., Brunain M. & Akol A.M., Descamps D. & de Graaf D. C., First detection of *Paenibacillus larvae* the causative agent of American Foulbrood in a Ugandan honey bee colony, *Springer Plus*, 5 (1) (2016): 36-42. <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs40064-016-2767-3>
- [35] Morán A., (2011) Actual situation of American Foulbrood in Chile, according the Project Fondo SAG N° 24 and projections. 42<sup>nd</sup> Congreso Internacional Apimondia Buenos Aires, Argentina.
- [36] Krongdang S., Comparative susceptibility and immune responses of Asian and European honey bees to the American foulbrood pathogen, *Paenibacillus larvae*, *Insect science*, 26 (5) (2019): 831-842. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12593>
- [37] Stephan J.G., De Miranda J.R. & Forsgren E., American foulbrood in a honey bee colony: spore-symptom relationship and feedbacks between disease and colony development, *BMC ecology*, 20 (1) (2020): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12898-020-00283-w>
- [38] Crudele S., Ricchiuti L., Rubert A. & Rossi F., Quantitative PCR (qPCR) vs culture-dependent detection to assess honey contamination by *Paenibacillus larvae*, *Journal of Apicultural Research*, 59 (2) (2020): 218-222. <https://doi.org/10.1101/741801>
- [39] Bassi S., Carpana E., Bergomi P. & Galletti G., Detection and quantification of *Paenibacillus larvae* spores in samples of bees, honey and hive debris as a tool for American foulbrood risk assessment, *Bulletin of Insectology*, 71 (2) (2018): 235-241. Disponible en ligne : <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol71-2018-235-241bassi.pdf>. Accédé le 25/11/2020
- [40] Andrade V.D.M., Flores J.L.H., López M.A.R. *et al.*, Evaluation of the presence of *Paenibacillus larvae* in commercial bee pollen using PCR amplification of the gene for tRNA<sup>Cys</sup>, *Braz. J. Microbiol.*, 50 (2019): 471–480. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00039-9>

---

Soumis le: 27/10/2019

Forme révisée acceptée le: 23/04/2020

Correspondant: [guelmamenerahma@outlook.com](mailto:guelmamenerahma@outlook.com)

---



---

**Revue**  
**Nature et Technologie**

<http://www.univ-chlef.dz/revuenatec>

ISSN: 1112-9778 – EISSN: 2437-0312

---

## Techniques utilisées pour le contrôle de la qualité structurale des viandes et des produits carnés (Review)

Rahma GUELMAMENE<sup>a</sup>, Omar BENNOUNE<sup>a</sup>, Rachid ELGROUD<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institut des sciences vétérinaires et des sciences agronomiques, université Batna 1, Algérie

<sup>b</sup> Institut des sciences vétérinaires d'ElKhroub, Université des frères Mentouri de Constantine 1, Algérie

---

### Résumé

Cet article donne un aperçu de quelques techniques développées pour accéder à une information fidèle sur la structure de la viande et des produits carnés. L'industrie de la viande a besoin d'informations fiables sur la qualité de la viande tout au long du processus de production afin de garantir aux consommateurs des produits carnés de haute qualité. Des informations fiables sur les caractéristiques organoleptiques de la viande (tendreté, saveur, jutosité, couleur), qui peuvent être fournies par différentes méthodes d'évaluation de la structure de la viande, soit par la force de cisaillement mécanique (Warner-Bratzler), optique (mesures de couleurs, fluorescence), mesures ultrasonores, ondes électromagnétiques, RMN, NIR, et ainsi de suite. Ces mesures sont souvent utilisées pour construire des images de structure de la viande qui sont fusionnées, puis traitées par analyse multi-image, ce qui nécessite des méthodes de traitement appropriées. Les caractéristiques de qualité liées aux propriétés mécaniques sont souvent mieux évaluées par des méthodes qui tiennent compte de l'anisotropie naturelle de la viande en raison de sa structure myofibrillaire, relativement linéaire. Les méthodes biophysiques d'évaluation peuvent être, soit par la mesure directe des propriétés des composants de la viande, soit par le calcul indirect en utilisant des corrélations évidentes entre une ou plusieurs mesures biophysiques et les propriétés des composants de la viande. Prendre ces calculs et modéliser les principales propriétés biophysiques pertinentes impliquées peut aider à améliorer notre compréhension des propriétés de la viande, des produits carnés et donc de la qualité.

Mots-clés : qualité ; produit carné ; structure de la viande ; contrôle ; microscopie ; propriétés optiques ; propriétés mécaniques ; polarisation ; anisotropie.

---

### Abstract

This article gives an overview of some techniques developed to access an accurate information on the structure of meat and meat products. The meat industry needs a reliable information about the quality of meat throughout the production process in order to guarantee consumers high quality of meat products. Reliable information's about the quality of meat (tenderness, flavor, juiciness, color) can be provided by different methods of evaluating the meat structure, either by mechanical shear force (Warner-Bratzler), optical (measurements color, fluorescence), ultrasonic measurements, electromagnetic waves, NMR, NIR, and so on. These measurements are often used to construct meat structure images that are fused, then processed by multi-image analysis, which requires appropriate processing methods. Quality characteristics related to mechanical properties are often better evaluated by methods that take into account the natural anisotropy of meat because of its relatively linear myofibrillar structure. Biophysical methods, for evaluation, can either directly measure the properties of the meat components, or calculate them indirectly using obvious correlations between one or more biophysical measurements and the properties of the meat components. Taking these calculations and modeling the main relevant biophysical properties involved can help improve our understanding of the properties of meat, meat products and therefore quality.

Keywords: quality; meat product; structure of meat; control; microscopy; optical properties; mechanical properties; polarization; anisotropy.

---



Cet article est mis à disposition gratuitement selon la licence [BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) de [Creative Commons Attributions 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

This article is available freely under the [BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license of [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## 1. Introduction

La fiabilité de l'information sur la qualité de la viande, y compris les produits carnés, peut être prouvée par un certain nombre de méthodes utilisées pour l'évaluation de la structure, la composition et l'hygiène. On ne peut décrire en détail, toutes les techniques, leurs modalités et leurs diverses applications (REF). Raison pour laquelle nous nous limiterons aux notions indispensables et qui sont en relation avec notre étude, structure et composition, qu'on passera en revue.

## 2. Techniques mécaniques

Ces techniques sont utilisées depuis les années trente. Elles présentent surtout l'intérêt pour des attributs sensoriels de texture.

La méthode peut être invasive, destructrice, ce qui nécessite un prélèvement (compression, traction et cisaillement), ou non invasive applicable sur le produit tel qu'il est (tests directs ou de résonance) [1]. La tendreté, la masticabilité et les petites fibres musculaires sont les caractéristiques de texture d'un produit carné [2].

### 2.1. Tests de cisaillement

Ensemble de tests utilisés pour évaluer la résistance mécanique avec une instrumentation appropriée : la lame Warner-Bratzler et la cellule de Kramer. Le principe est : la simulation de la masticabilité pour déterminer la texture ou la tendreté [3].

#### 2.1.1. Test de force de cisaillement de Warner-Bratzler

Ce test mesure la force de cisaillement maximale. Il a été largement utilisé pour déterminer la tendreté de la viande, des produits carnés, de poisson et des gâteaux [3, 4, 5]. La première étude a été réalisée sur une viande cuite en 1920 par Warner, puis elle a été développée en 1932 par Bratzler [6].

Cette méthode, pour la viande ou les produits carnés, nécessite une lame plate en V : épaisseur de 0,04 pouce, angle du V 60° et une vitesse de travail de 200-500

mm/min. De plus, l'échantillon doit être d'un demi-pouce (12,7mm) de diamètre et être conduit perpendiculairement à la lame [3] ; vu que les résultats ont montré des écarts entre une mesure prise dans l'orientation parallèle ou perpendiculaire à la longueur du muscle.

Cette dernière est plus cohérente avec la tendreté ( $r = 0,77$ ).

Des tentatives rationalisées ont utilisé des lames plates, force de cisaillement de tranche, et elles ont montré une forte corrélation avec la tendreté,  $r = 0,82$  [7].

Comme exemple, l'essai de Warner-Bratzler a été utilisé, à 100 mm/min, pour évaluer les changements de la qualité d'une viande ovine en réponse à des cycles congélation-décongélation répétés. Le test a donné de bons résultats, en comparaison avec l'histologie (la microscopie optique), la mesure de pH et de la couleur [8].

#### 2.1.2. La cellule de Kramer

La méthode a été développée, en 1959 par Kramer et Bernard, et utilisée pour évaluer la texture des produits fins, cas de la viande hachée. Elle nécessite une chambre avec un jeu de 5-10 lames parallèles. Le nombre de lames, est supposé, supprimer les écarts [3].

Lame Warner-Bratzler ou cellule de Kramer, la tendreté est appelée la résultante de la longueur des sarcomères, la protéolyse *post-mortem*, la quantité et la distribution spatiale du tissu conjonctif [2, 3], caractères faciles à évaluer en histologie.

### 2.2. Méthodes échographiques

Deux méthodes échographiques peuvent être utilisées pour évaluer la qualité fonctionnelle des produits carnés : l'élastographie ultrasonore ou "transitoire" [9] et l'analyse spectrale par ultrasons [10].

Le principe est la mesure de la vitesse de propagation des ondes, qui dépend de la composition et la structure de l'échantillon. La proportion et l'orientation des fibres musculaires donnent une bonne prédiction de la texture [1], la teneur en gras est corrélée à la vitesse de propagation des ultrasons, la teneur en viande est inversement corrélée à cette vitesse [11].

Enfin, l'échographie pour des échantillons musculaires, en termes de teneur en gras et en collagène,



a présenté de meilleurs résultats par rapport à une simple analyse des propriétés chimiques et mécaniques [12].

Toutefois, l'élastographie transitoire a été décrite comme une nouvelle technique, non invasive, peu coûteuse et capable de travailler dans des milieux anisotropes : cas du muscle [13].

Nowak (2015) a réalisé une étude, pour évaluer la capacité des ultrasons, de vérifier si un produit carné contient la matière première déclarée par le fabricant : viande de volaille ou de porc. Les résultats ont permis la distinction en fonction de la vitesse des ultrasons [14].

### 3. Techniques diélectriques

#### 2.3. Mesure d'impédance

L'impédance a une composante résistive et une capacitive (contrairement à la résistance qui est indépendante de la fréquence du courant) ; c'est la propriété d'un milieu de s'opposer à l'écoulement du courant électrique. La première mesure d'impédance appliquée sur la viande a été publiée en 1920, sur des viandes DFD (en Anglais *Dark, Firm, Dry* : foncée/sombre, dure/ferme et sèche), ensuite, et depuis 2000, elle a permis la détection des viandes congelées et PSE (en Anglais *Pale, Soft, Exudative* : Pâle, Molle et Exsudative) [15, 16].

La viande a une impédance anisotrope, qui varie selon que le courant est parallèle ou perpendiculaire à la fibre musculaire [17]. De plus, le muscle a une forte impédance, contrairement à celle du gras [16]. La technique couvre un large éventail dans la technologie des produits carnés : mesure de pH et de la teneur en matières grasses, détection des viandes surgelées et prédiction de la tendreté [01].

#### 2.4. Caractérisation par les microondes

Elle repose sur l'interaction des microondes, de faibles puissances électromagnétiques (0,3-300 GHz), avec le tissu pour exploiter ses propriétés diélectriques.

Ces propriétés diélectriques dépendent de la liaison d'eau dans le tissu ainsi que sa composition. La viande a une propriété diélectrique anisotrope qui diminue au cours de la dégradation cellulaire [1]. Comme la technique est liée à la présence d'eau, elle a été exploitée pour déterminer la capacité de rétention d'eau, l'Aw et les viandes DFD/PSE (citées ci-dessus) [18].

#### 2.5. La chromatographie

En phase liquide ou gaz-liquide, la chromatographie n'est pas une méthode concurrente mais complémentaire. Elle repose sur le fait d'une migration différentielle des composants sous l'action du déplacement du support. Pour les produits carnés, elle permet l'analyse des constituants : protéines, lipides, glucides et vitamines [19].

La chromatographie liquide, en interaction à la spectrométrie de masse, a été entreprise pour étudier les changements de la couleur d'une viande, ovine, liés aux conditions de stockage.

Les principaux métabolites détectables dans les échantillons mal stockés étaient : les acides aminés, les sucres, les nucléotides et nucléosides, les acides organiques et leurs produits de dégradation et, pour la première fois, des complexes de bore-sucre-acide malique liés à la chimie de la myoglobine (ils ont des propriétés antioxydantes) [20].

#### 2.6. L'électrophorèse

Le principe est de faire déplacer les macromolécules constitutives de l'échantillon. Cela se fait sous l'action d'un champ électrique et sur un support liquide ou solide.

Il s'agit d'une technique de fractionnement, qui constitue un outil universel d'analyse et de contrôle de la qualité de nombreux produits alimentaires. Pour la lecture, un spectrophotomètre est utilisé donnant des résultats en diagramme [21].

Plusieurs études ont exploité la technique en sciences des viandes et des produits carnés, cas de l'électrophorèse capillaire sur gel. Celle dernière a été utilisée pour différencier des viandes, de poulet, séparées mécaniquement (VSM) de celles désossées à la main HDM (*hand deboned meat* en Anglais) ; en utilisant un réactif spécifique à l'hémoglobine (celle-ci est très élevée dans les VSM).

La technique testée dans des mélanges VSM-HDM a permis de distinguer des mélanges contenant jusqu'à 7,5 % de VSM de celui à 0% [22].

### 3. Techniques lourdes

#### 3.1. Analyses par les rayons X

La méthode a été utilisée, en industries agro-alimentaires, pour détecter les substances cristallines et semi-cristallines et elle a donné des résultats concernant la structure de l'échantillon [23]. Le principe est de mesurer l'atténuation de l'énergie pénétrante. Pour la viande et les produits carnés, les graisses ont une faible absorption des rayons X, 62 keV, celle de l'os et le muscle est plus élevée, 120 keV [1].

Parallèlement, l'absorptiométrie à DXA (*Dual-energy X-ray Absorption*), a permis de prédire la tendreté et d'analyser la composition des produits carnés. Le principe est d'utiliser deux mesures d'absorption des rayons X, faible et élevée, coupler et soustraire l'une de l'autre, donne le pourcentage du gras et du maigre [24, 25].

Parler des rayons X, pour la viande ou les produits carnés, on prédit qu'il s'agit de la détection de l'os, cela est vrai. L'industrie a évolué de sorte qu'elle offre des appareils, avec des rayons X, qui trouvent automatiquement l'os et d'autres corps étrangers dans la viande.

Cas du système de détection osseuse *SensorX*, où le produit avec os est rejeté sur un poste de travail avec un affichage indiquant l'emplacement précis de l'os (sur un moniteur). Ce dernier est enlevé par un opérateur, avant que le produit ne soit réexaminé. Le *SensorX Smart Sort* combine la détection des os et le classement des viandes, selon la teneur en os [26].

### 3.2. Analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN)

L'analyse a reconnu deux domaines d'application "l'analyse structurale" et "le dosage et le contrôle de la qualité", devenant ainsi une technique assez puissante dans le secteur alimentaire, surtout pour les produits à base de viande. Selon l'objectif recherché, on peut avoir une analyse à basse résolution et à onde continue, impulsionnelle ou de haute résolution à onde impulsionnelle (pour les protéines, surtout) [27].

La technique est basée sur l'absorption et l'émission de l'énergie, dans la gamme de radiofréquence du spectre électromagnétique d'un noyau à nombre d'électrons impairs. L'hydrogène, le carbone et le sodium sont les plus mesurés, cas de la RMN  $^{23}\text{Na}^+$  (le sodium) [1, 25]. L'exploitation du phénomène de résonance se fait par spectroscopie ou en imagerie.

### 3.3. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie et la relaxométrie ( $T_1$  : temps de relaxation longitudinale,  $T_2$  : pour la transversale) sont deux zones de la résonance magnétique nucléaire, très exploitées en sciences des viandes [25]. La première a réussi grâce à sa capacité de caractériser la structure et l'eau des échantillons hétérogènes, la deuxième a permis de mesurer l'Aw [28].

Comme exemple, la spectroscopie RMN a permis de suivre les changements structuraux de la viande pendant la cuisson, la dénaturation thermique du tissu conjonctif [29, 30] et de différencier entre la viande de bœuf et celle de cheval [31]. Alors que la spectroscopie RMN- $^{23}\text{Na}^+$  a été décrite pour la quantification absolue des fractions libres et liées de sodium, facteurs technologiques déterminants pour les produits carnés salés, saumurés et séchés [32]. D'autres chercheurs ont consacré leurs études aux applications RMN pour le poisson [33].

### 3.4. Imagerie par résonance magnétique (IRM) :

Les premières applications de l'IRM sur les viandes ont permis de déterminer le type des fibres musculaires [34].

Elle a comme principe, l'exécution des séquences de la résonance magnétique nucléaire, en une image ; les signaux des différents composants sont sélectionnés puis identifiés (image distinguant l'eau, l'os, la graisse et le muscle). Alors que la micro-imagerie, des résonances magnétiques nucléaires, donne des résultats quantitatifs [1].

Toutefois, l'IRM combinée à la spectroscopie  $^{23}\text{Na}^+$  a donné des résultats complémentaires pour identifier les deux populations du sodium (liée et libre), les localiser et même de les quantifier : données assez importantes pour la saumure [35].

### 3.5. Elastographie par résonance magnétique

Le principe de cette technique est de mesurer les propriétés viscoélastiques dans un tissu, en suivant une onde acoustique électromécanique [1].

Dans la même revue, il a été mentionné que l'élastographie n'a pas été encore utilisée en sciences des viandes, jusqu'en 2008. Alors qu'elle est en cours de développement à l'institut national de la recherche

agronomique en France, pour mesurer les paramètres mécaniques ainsi que les changements structuraux, survenant dans un produit carné après un traitement donné.

En 2010, elle a été qualifiée comme méthode non destructive, permettant l'obtention des propriétés viscoélastiques des produits alimentaires avant et après l'emballage [36].

#### 4. Techniques optiques

##### 4.1. La spectroscopie

Les méthodes spectroscopiques ont été largement utilisées pour l'évaluation et le contrôle de la qualité des produits carnés, tant en laboratoire qu'en industrie des viandes [37]. Le principe est fondé sur la propriété qu'ont les atomes d'absorber ou d'émettre un flux de photons (spectroscopie d'absorption ou d'émission atomique) [38].

L'évaluation de la teneur en collagène est la principale différenciation tissulaire, utilisée pour les produits carnés en spectroscopie [39, 40].

La spectroscopie couvre le proche infrarouge (PIR), l'infrarouge (IR), le visible et l'ultraviolet (UV) y compris la fluorescence.

##### 4.1.1. Spectroscopie infrarouge

La technique, telle que conclue par les experts, peut être l'avenir dans l'industrie agro-alimentaire.

Les avantages majeurs de celle-ci sont la répétabilité élevée des résultats, et leur corrélation avec ceux estimés par l'évaluation sensorielle experte et le test de Warner-Bratzler [3].

Ce type de spectroscopie traite la région infrarouge du spectre électromagnétique, 800 à 2500 nm, et qui est exploitée pour le contrôle de la qualité des produits carnés [1].

Le principe est que le tissu peut absorber des parties des rayons infrarouges, entrants, et donner une "empreinte digitale" ou un spectre, lorsque son état vibratoire change [39]. Parallèlement, plusieurs techniques de spectroscopie infrarouge existent ; elles diffèrent, les unes des autres, par la fréquence et les paramètres optiquement mesurés (transmission, réflexion, diffusion...) [25].

En industrie alimentaire, la spectroscopie infrarouge a été utilisée pour surveiller et évaluer la composition et la qualité depuis le début des années soixante [41].

Alors qu'elle a un défi majeur, qui est la présentation de l'échantillon ; la spectroscopie infrarouge est inappropriée pour les échantillons solides non dilués, contrairement à la spectroscopie de réflexion dans le proche infrarouge [1]. Cette dernière permet, pour le contrôle de la qualité des produits carnés, le dosage de l'eau, des protéines, des lipides et des glucides [42].

##### 4.1.2. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les développements de la spectroscopie infrarouge ont élargi ses applications dans n'importe quelle partie d'un produit, cas de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (spectroscopie IRTF). C'est une technique relativement récente, qui offre un grand potentiel pour le contrôle de la qualité et la structure de la viande. Elle a permis aussi l'évaluation de la capacité de rétention d'eau [43], le tri des viandes en une de première classe et de haute qualité, pour être vendus à un prix élevé, ou en une viande à transformer [44]. Alors que la micro-spectroscopie IRTF a montré des changements microscopiques (dans une viande salée) [45].

L'interprétation quantitative des résultats de la spectroscopie IRTF est possible, en utilisant des méthodes chimiométriques avancées. Celles-ci permettant des calculs rapides tel que l'estimation de la charge bactérienne, directement, à partir de la surface de la viande [46].

Enfin, la spectroscopie infrarouge avec sa rapidité, facilitée d'utilisation, polyvalence et disponibilité pour l'évaluation finale des produits carnés, elle ne permet pas la mesure directe de texture, mais seulement une prédiction et une détermination approximative : des étalonnages précis doivent être établis par des tests chimiques de référence [3].

##### 4.1.3. Spectroscopie Raman

C'est une spectroscopie en diffusion [38], qui dérive de la spectroscopie infrarouge moyenne.

Le principe est la mesure de la décroissance des vibrations, qui est observée après une forte excitation de l'échantillon (avec laser) [25].

Avant d'être étudiés en sciences des aliments, la spectroscopie Raman a été utilisée en biomédecine pour déterminer le degré de saturation des acides gras [47] ; un aspect nutritionnel important qui a permis son utilisation ultérieure en sciences alimentaires.

Bocker *et al.*, (2007) ont conclu que la spectroscopie Raman est aussi forte que la spectroscopie infrarouge, informations similaires et complémentaires, pour détecter les changements de la structure musculaire [121]. Il a été démontré, aussi, que la diffusion Raman est capable de déterminer la capacité de rétention d'eau de la viande fraîche [48], et de prédire la tendreté, en mettant la relation entre les pertes à la cuisson et la force de cisaillement, les résultats étaient prometteurs selon Schmidt *et al.*, (2013) [49].

L'un des grands avantages de cette technique est sa capacité à fournir des informations à l'échelle macroscopique et microscopique, sur la structure et la concentration d'une substance donnée dans son microenvironnement, dans des tissus et des cellules intactes (c'est-à-dire *in situ*) [1, 25].

#### 4.1.4. Spectroscopie visible et la colorimétrie

La couleur est une propriété organoleptique impliquée dans l'évaluation de la qualité et la salubrité de toute denrée alimentaire. La stabilité de la couleur de la viande est déterminée par des facteurs inhérents à l'animal, les propriétés antioxydantes endogènes, maintenant par la myoglobine à l'état oxygéné et par les conditions du post-abattage [20].

L'utilisation de la lumière visible pour accéder aux informations structurelles du muscle n'est pas un nouveau concept. Rome (1967) a appliqué la diffusion de la lumière sur le muscle de lapin isolé, pour mesurer la longueur du sarcomère [50].

Cependant, la détection précoce des viandes pâles, molles et exsudatives (PSE) a été l'application majeure de la spectroscopie visible et de la colorimétrie ; Liu et Chen (2001) ont étudié les changements structuraux de la viande par rapport à la dégradation *post mortem* [51]. Xia *et al.*, (2007) ont mesuré la longueur des sarcomères et la teneur en collagène [52].

Quant à la colorimétrie, la technique est simple, rapide et applicable dans plusieurs branches, entre autre, les viandes et les produits carnés ; le principe est de comparer la couleur de l'échantillon avec des échelles colorimétriques, et parfois elle est couplée à la spectroscopie [53]. La mesure de couleur se fait aussi par des colorimètres, où les coordonnées de couleur seront enregistrées [8].

Ces techniques ont été utilisées par de nombreux chercheurs : Guroi et Kahraman (2011) ont caractérisé l'effet de l'étirement sur l'ultrastructure musculaire, Kadim *et al.*, (2013) ont évalué la composition, la qualité et les traits histologiques de certains muscles de dromadaire [5].

La couleur indique, aussi, la tendreté de la viande et l'état d'oxydation de la myoglobine dans les produits carnés (rouge : oxy-myoglobine, marron : met-myoglobine) [16].

## 4.2. La spectrométrie

C'est l'exploitation quantitative de l'interaction matière-rayonnement, on distingue :

- Spectrométrie d'absorption moléculaire (identification et mesure de concentration).
- Spectrométrie d'émission atomique (dosage chimique).
- Spectrométrie d'absorption atomique : capable de quantifier plus de soixante éléments, surtout ceux qui sont en forme de "traces" [54].

### 4.2.1. Spectrométrie de fluorescence

La fluorescence frontale a été utilisée, surtout, pour les échantillons opaques, cas de la viande et les produits carnés, comme ces produits sont riches en tryptophane (l'élément révélé par la fluorescence frontale). Le tissu conjonctif est le fluorophore le plus intrinsèque dans la viande, son intensité est un bon marqueur de la tendreté [55].

Swatland, depuis 1985, a publié plusieurs études sur la capacité de l'auto-fluorescence d'évaluer la qualité de la viande, jusqu'au temps où il a développé des sondes pour des mesures en ligne de la fluorescence et de la réflexion [56]. La spectroscopie de fluorescence frontale a montrée sa capacité d'évaluer la texture de la viande [57], et même la fraîcheur du poisson [58].

Comme les tissus musculaires sont des structures anisotropes, celles-ci diminuent la fluorescence en *post mortem* montrant ainsi les changements structuraux dans les tissus à cette période [59].

En fin, il est important de noter que la fluorescence frontale est une analyse sélective, car elle dépend de la longueur d'onde d'excitation [60].

#### 4.2.2. Spectrométrie de masse

Utilisée pour reconnaître la structure fine d'une denrée alimentaire, la technique est dite performante, mais lourde, de plus en plus envisageable et peut devenir une spectrométrie de paillasse dans les laboratoires de recherche et de contrôle de qualité [61].

### 5. Techniques biochimiques

#### 5.1. L'analyse enzymatique

C'est une branche de la chimie analytique, dont le principe est "*la pratique de dosages dans les quels interviennent une ou plusieurs réactions enzymatiques*". Dans le domaine alimentaire, l'analyse enzymatique permet de déterminer la présence du substrat et le quantifier ; elle a été utilisée pour contrôler la qualité des boissons (dosage des sucres par exemple), du lait (dosage de matière grasse), des viandes et produits carnés (évaluation de la maturation) et de poisson (différenciation entre frais et congelé) [62].

La méthode de  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA-déshydrogénase, par exemple, est une analyse enzymatique récente, utilisée pour distinguer les viandes fraîches et décongelées [63].

#### 5.2. L'analyse immunologique ou immunochimique

C'est une branche fondamentale des sciences médicales mais également une technologie, dont le principe est l'interprétation des réactions antigène-anticorps (Ag-Ac). Elle est appliquée en industrie agro-alimentaire sur plusieurs secteurs : l'évaluation de la composition de la matière première et du produit fini (protéines d'un produit carné), la distinction des additifs, le suivi de la fabrication et la détection des défauts (dégradation) [64].

Par exemple, dans un mélange contenant 300 viandes de différentes espèces animales, la détection d'une espèce donnée est possible grâce à l'utilisation d'antisérum spécifique à un antigène de l'espèce cible ou recherchée.[65]. Les tests ELISA, indirect, compétitif et Sandwich, sont des méthodes hautement sensibles permettant la détection jusqu'à 2 % d'adultération [66]. Cependant, Chen et Hsieh (2000) ont utilisé des anticorps monoclonaux pour détecter la viande de porc ajoutée frauduleusement dans des produits carnés [67].

### 6. Techniques d'analyse d'image

L'analyse d'image, comme le nom l'indique, consiste en l'obtention d'une image par un capteur photosensible, caméra par exemple, et de la traiter par des logiciels.

Pour la science des viandes et des produits carnés, la technique permet de relever trois utilisations principales : le contrôle de la qualité, l'analyse de la microstructure des produits (par la microscopie optique) et la thermographie infrarouge [68].

L'analyse de l'image par ordinateur est une méthode qui permet de réaliser l'évaluation de toutes les caractéristiques visuelles, grâce à l'utilisation d'algorithmes spécifiques, à savoir : la couleur du muscle, la distribution de la graisse et du tissu conjonctif [69], la taille, la forme, la localisation, y compris l'épaisseur et la composition des fibres musculaires. Enfin, l'analyse d'image donne des résultats rapides et peut être utilisée dans la recherche "en ligne" : méthode répétitive, non destructive et bien corrélée à l'évaluation chimique et sensorielle [3].

La technique d'analyse d'image est appelée, aussi, bioimagerie [70].

Les images peuvent être macroscopiques ou microscopiques, histologiques, et leur analyse peut générer des mesures précises et objectives des principales composantes structurelles du tissu musculaire.

#### 6.1. L'image macroscopique

La notion n'est pas récente, Shiranita et al., (1998) ont décrit la méthode pour déterminer la qualité de la viande, le "score persillé" et analyser la texture [71].

D'ailleurs l'inspection visuelle a été largement utilisée pour évaluer la qualité des denrées alimentaires, allant jusqu'au consommateur, et de nombreuses recherches ont étudié cette possibilité : prédire la qualité de la viande à partir d'une image macroscopique [72, 73, 74].

La teneur en tissu conjonctif, ainsi que sa distribution spatiale définissent le grain de la viande (marbrée ou persillé), il est lié à la tendreté. Ses deux composants clés, le collagène et la graisse, sont clairement visibles sur les images macroscopiques ; la technique a été utilisée pour prédire la tendreté [75]. Chandraratne et al., (2006) ont utilisé les caractéristiques de surface dans le même contexte, les résultats ont montré une relation significative entre la surface de la viande crue, cuite et la tendreté (relation géométrie-texture) [76].

## 6.2. L'image microscopique

Il y a plus de deux mille ans où la découverte que l'on pouvait voir une image agrandie d'un petit objet en utilisant les "lentilles" est possible [77].

Pour obtenir une image microscopique d'un tissu, le type du microscope utilisé est variable, selon l'objectif de l'étude et la nature de l'échantillon, et nécessite la préparation de tranches tissulaires fines. On parle, donc, d'histologie qui a toujours besoin de coupes en micromètres [78]. La technique a été largement utilisée pour contrôler la qualité structurale de la viande et des produits carnés :

### 6.2.1. Le microscope optique

Depuis plus d'un siècle, le microscope optique a été l'un des instruments les plus importants, indispensable aux biologistes de toutes les disciplines. En réalité, il reste l'équipement le plus important en histologie, permettant d'ouvrir les secrets des choses trop petites à percevoir avec l'œil nu [77, 79, 120] :

- Ordre de grandeur entre quelques millimètres à quelques micromètres ( $\mu\text{m}$ ).
- Pouvoir de résolution de 0,3 à 0,1 $\mu\text{m}$  [80, 81].

Plusieurs études ont été publiées sur l'utilisation du microscope optique pour le contrôle de la qualité des produits carnés, comme un outil d'analyse topographique [70, 114, 115]. Toutefois, pour des analyses plus poussées des microscopes optiques spéciaux sont

utilisés, selon l'objectif recherché, et pour plus d'informations, principes et domaines d'utilisation, voir les détails expliqués par Douglas (2001), Macé et al., (2008), Wayne (2009) et Chen et al., (2011) [67, 78, 116, 117].

### 6.2.2. Le microscope confocale à balayage laser

C'est une technique de fluorescence, issue d'un développement du microscope optique en épifluorescence, avec des capacités à produire des images en 3D [1, 80].

La microscopie à balayage laser confocale est la plus applicable en sciences des viandes ; elle est surtout utilisée pour prédire les changements de la microstructure, la distribution de l'eau dans la viande fraîche et cuite [80] et pour évaluer la tendreté [82].

Ce type de microscopie peut être combiné à d'autres techniques pour mieux exploiter ses qualités ; cas de la microscopie électronique à balayage, pour une révélation détaillée de la microstructure [83].

### 6.2.3. Le microscope électronique

Le microscope électronique, à balayage ou à transmission selon l'application, est aussi utilisé dans les investigations biologiques. Le principe est l'interaction des composants du tissu avec un faisceau d'électrons ; permettant une augmentation de la résolution à mille fois par rapport au microscope optique et qui est de l'ordre de 0,1 nanomètre (nm) [79, 81].

Récemment, il y eu même le couplage de sonde à rayons X au microscope électronique pour réaliser une X-microanalyse, *in situ* [84].

#### 6.2.3.1. Le microscope électronique à balayage

Ce type de microscope donne des images microscopiques avec une grande profondeur, et un affichage en 3D caractéristique de la surface de l'échantillon observé. Le faisceau d'électrons ne traverse pas le spécimen, il est balayé à la surface du tissu et il sera reflété et capturé par un détecteur. Ce dernier le traite en une image microscopique, en noir et blanc, sur un moniteur, facile à interpréter : c'est une vue en 3D illuminée d'en haut [1, 81].

Revenant à l'utilisation du microscope électronique à balayage dans la science des viandes et des produits



carnés, l'outil est de haute performance. Il permet, à titre d'exemple, de suivre les changements de l'ultrastructure du muscle liés au chauffage [85], ou liés au marinage [86] et de juger la tendreté [87]. De plus, ce microscope peut augmenter de ses qualités en le "modifiant", cas du :

- Cryo-microscope électronique à balayage. Le tissu est observé après une cryofixation qui le protège des pertes causées par les traitements classiques. À titre d'exemple, la technique a été utilisée pour évaluer les effets de la température de cuisson sur la microstructure de l'endomysium et du périmysium ; Celle-ci affecte, à son tour, la couleur et les propriétés mécaniques de la viande [88].
- Microscope électronique à balayage environnemental, conçu pour observer les tissus sans les déshydrater ou les congeler [01]. Ce type de microscope a été utilisé pour prédire la tendreté et montrer la dénaturation des fibres musculaires, liées à différentes méthodes de cuisson [89].

#### 6.2.3.2. *Le microscope électronique à transmission*

Sur des coupes histologiques ultraminesces, 30 à 80 nm d'épaisseur, ce genre de microscope donne des images de qualité et de résolution supérieure à celles obtenues par son équivalent à balayage ; les électrons passent à travers l'échantillon [80, 81, 90].

Cependant, la technique est rendue difficile, car les échantillons doivent être très minces et mis sur une grille pour être observés [1, 79]. Ce type de microscope peut être utilisé pour :

- Evaluer certaines techniques utilisées pour amplifier la tendreté de la viande, comme l'utilisation d'enzymes protéolytiques [91].
- Montrer, en association avec l'histologie, que si la congélation est appliquée dans les bonnes conditions, les cycles de congélation-décongélation répétés ne modifient pas l'ultrastructure du muscle d'une manière significative [92].
- Suivre les propriétés ultrastructurales du muscle pendant le stockage réfrigéré [93].

En fin, la combinaison ou l'analyse "multi-microscopique" peut être utilisée pour créer une carte corrélative détaillée de la structure et la composition de l'échantillon examiné [94].

## 7. Autres techniques

### 7.1. L'analyse microbiologique

La viande et les produits carnés sont d'excellents milieux de croissance pour les microorganismes. McClure (2002) a énuméré les principales bactéries comme il a mentionné les conditions dans lesquelles elles peuvent contaminer un produit carné [95].

L'analyse microbiologique classique consiste à qualifier et quantifier les microorganismes dans un échantillon, elle passe par une série d'étapes :

- Revivification : réaliser une suspension dans laquelle le prélèvement est dilué.
- Mise en culture, sur les milieux de culture.
- Confirmation et sélection des colonies, en vue de les purifier puis les caractériser par voie biochimique, moléculaire ou sérologique [96].

La technique est importante, voire primordiale, pour toutes les denrées alimentaires. Cependant, il est utile de signaler que :

- La détérioration de la viande dépend d'une fraction de microorganismes, dite l'ODE : les organismes de détérioration éphémères [97].
- La réduction de la détérioration et des bactéries inductrices est importante pour la stabilité microbiologique de la viande et des produits carnés [98].
- Dans les produits prêts à consommer les Staphylocoques étaient les plus détectés suivis de *Listeria* et en fin les *E. coli* [99].
- Les produits emballés sous atmosphère modifiée présentent une croissance microbienne retardée et une durée de conservation augmentée [100].
- L'irradiation gamma, pour la conservation, était efficace pour réduire la charge microbienne sans nuire à la physicochimie des produits carnés [98].
- Pour accélérer la détection de l'altération microbienne, la spectroscopie de Fourier (IRTF) utilisée directement à la surface des aliments donne des "empreintes digitales", biochimiquement interprétables, permettant de quantifier la charge microbienne en 60 secondes [101].
- La mise en œuvre des mesures d'HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) obligatoire dans les

établissements de transformation de la viande est la solution idéale [102].

- Les vétérinaires sont les spécialistes ayant les outils scientifiques nécessaires pour la mise en œuvre du concept "One Health", pour mieux protéger le consommateur [103, 105]

En dehors de la notion de l'écosystème microbiologique des produits carnés, déjà révélé, les microorganismes présentent des spécificités enzymatiques qui autorisent leurs utilisations au laboratoire, comme ils sont capables de réactions d'analyses qualitatives et quantitatives, cas de la détection des vitamines [105].

### 7.2. Techniques utilisant la PCR et l'analyse d'ADN

Les techniques basées sur la PCR (*polymerase chain reaction*) sont assez puissantes, cas du polymorphisme de longueur des fragments de restriction et l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe [63].

Néanmoins, l'analyse de l'ADN, par hybridation ou par amplification, est supérieure en termes de spécificité, d'exactitude, de fiabilité et d'acceptabilité juridique :

- L'ADN présente une stabilité thermique assez élevée et permet potentiellement d'obtenir des informations rapides et pratiques [66].
- Les molécules d'ADN sont dégradées en post mortem (par les endo et les exo nucléases). L'hydrolyse, l'oxydation et le degré d'endommagement de celui-ci contribue à la distinction des viandes fraîches et congelées [63].

D'ailleurs, l'ADN est relié directement à la spécificité de l'espèce animale source de la matière première ; il est omniprésent avec des informations génétiques indépendantes de la source de l'échantillon [66]. Parallèlement, la majorité des études publiées, que ce soit pour l'ADN ou la PCR, porte sur ce sujet, la spécificité de l'espèce. Exemples :

- Un test basé sur la PCR a été utilisé pour la détection de la viande de porc, dans des saucisses fraîches de cheval. Le test développé a montré la présence de celle-ci dans 6/30 des échantillons examinés [106].
- Une PCR en temps réel a été utilisée pour authentifier des produits carnés avec des mélanges contenant de la viande de bœuf, porc, cheval, mouton, poulet et de la dinde. Il a été possible d'identifier les viandes de

ces espèces à des teneurs allant jusqu'à 0,05 % voire même 0,01% [117].

- L'ARNr 12S et 16S mitochondriaux ont été révélés par PCR, pour l'identification de la plupart des espèces animales et pour distinguer les différentes viandes ajoutées frauduleusement dans les aliments [107].
- Un test de PCR en temps réel spécifique au porc (SYBR vert I) a été développé pour résoudre le problème de substitution de viande de porc. La technique a été considérée comme une méthode robuste pour l'authentification Halal de la viande [108].
- Singh et Sachan (2011) ont exposé, en revue, les techniques utilisées pour authentifier l'espèce animale source de matière première, ADN et PCR ont été parmi les méthodes citées [109].

### 7.3. Évaluation sensorielle

Dans l'évaluation des attributs sensoriels par le consommateur, la qualité de la viande, y compris les produits carnés, est associée à quatre caractéristiques principales qui sont la tendreté, la jutosité, la couleur et la saveur [3].

Pour décrire la technique de l'évaluation sensorielle, on peut redire que l'homme est le "générateur des données", puis dire que la procédure est délicate et obéit à un ensemble de règles (par exemple, définir les caractères du groupe qui évaluera les échantillons), et elle consiste à donner des résultats "sensoriels" à savoir le goût [110, 111].

### 7.4. Analyse des produits Halal

À l'échelle mondiale, les consommateurs musulmans s'inquiètent d'un certain nombre de problèmes concernant la viande et les produits carnés qu'ils consomment ; cas de la substitution avec tout ce qui est d'origine "porc", le plasma sanguin non déclaré, l'utilisation d'ingrédients interdits, les boyaux et les méthodes d'abattage non Halal [112, 113].

Nakyinsige et al., (2012) ont donné une explication complète de ce type de fraudes alimentaires, ainsi que les techniques utilisées pour les mettre en évidence, à savoir :

- Substitution de porc : PCR, détection de protéines spécifiques par l'ELISA et détection du lard par spectroscopie.
- Plasma sanguin : utilisation de la focalisation isoélectrique sur couche ultramince.
- Ingrédients non-viande : les certificats Halal sont indispensables [112].

## 8. Conclusion

Toutes ces techniques nécessitent un équipement spécial, non seulement pour effectuer le test mais également pour interpréter les résultats. D'une part, chacune présente des avantages et des inconvénients. De l'autre part, l'application de l'une ou de l'autre et même la combinaison des techniques dépend de l'objectif de la recherche, et est fondée sur un ensemble de critères. Le but restant toujours le même : réduire le rapport coût sur bénéfice de l'analyse. Le bénéfice escompté est de pouvoir prendre une décision, avec des risques acceptés, de déclarer qu'une denrée alimentaire est conforme ou non.

La science est en évolution exponentielle et la porte est toujours ouverte pour de nouvelles techniques, ce qui répond aux besoins de l'industrie des produits carnés.

Aujourd'hui, les technologies modernes non destructives, non invasives, y compris les méthodes de spectroscopie dans le proche infrarouge et l'analyse d'image par ordinateur sont les méthodes les plus recommandées [3].

## Références

- [1] Damez J. & Clerjon S., Meat quality assessment using biophysical methods related to meat structure. *Meat Science*, 80 (1) (2008) : 132–149. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.039>
- [2] Dinh T.N, Meat quality: understanding of meat tenderness and influence of fat content on meat flavor. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 9(12) (2008): 65–70.
- [3] Guzek D., Pogorzelska E., Pogorzelski G. & Wierzbicka A., Instrumental texture measurement of meat in a laboratory. *Advances in Science and Technology – Research Journal* ., 7 (19) (2013) : 5–11. <https://doi.org/10.5604/20804075.1062329>
- [4] Bayraktaroglu A. G. & Kahraman T., Effect of muscle stretching on meat quality of biceps femoris from beef. *Meat Science MESC*, 88 (3) (2011) : 580–583. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.02.021>
- [5] Kadim I. T., Al karousi A., Mahgoub O., Al Marzooqi W., Khalaf S. K., Al Maqbali R. S., Chemical composition, quality and histochemical characteristics of individual dromedary camel (*Camelus dromedarius*) muscles. *Meat Science MESC*, 93 (3) (2013) : 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.028>
- [6] Wheeler T. L., Shackelford S. D., Johnson L. P., Miller M. F., Miller R. K. & Koohmaraie M. A., Comparison of Warner-Bratzler shear force assessment within and among institutions. *Journal of Animal Science*, 75 (9) (1997) : 2423–2432. <https://doi.org/10.2527/1997.7592423x>
- [7] Wheeler T. L., Vote D., Leheska J. M., Shackelford S. D., Belk K. E., Wulf D. M., Gwartney B. L. & Koohmaraie M. A., The efficacy of three objective systems for identifying beef cuts that can be guaranteed tender. *Journal of Animal Science*, 80 (12) (2002) : 3315–3327. <https://doi.org/10.2527/2002.80123315x>
- [8] Qi J., Li C., Chen Y., Gao F., Xu X. & Zhou G., Changes in meat quality of ovine longissimus dorsi muscle in response to repeated freeze and thaw. *Meat Science*, 92 (4) (2012) : 619–626. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.06.009>
- [9] Ophir J., Miller R. K., Ponnkantani H., Cespedes I. & Whittaker A. D., Elastography of beef muscle. *Meat Science*, 36 (1–2) (1994) : 239–250. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(94\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0309-1740(94)90043-4)
- [10] Abouekaram S., Berge P. & Culioli J., Application of ultrasonic data to classify bovine muscles. In *Proceedings of IEEE Ultrasonics Symposium*. (1997) : 1197–1200. <https://doi.org/10.1109/ULTSYM.1997.661793>
- [11] Benedito J., Carcel J. A., Rossello C. & Mulet A., Composition assessment of raw meat mixtures using ultrasonics. *Meat Science*, 57 (4) (2001) : 365–370. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00113-3)
- [12] Mörlein D., Rosner F., Brand S., Jenderka K. V. & Wicke M., Non-destructive estimation of the intramuscular fat content of the longissimus muscle of pigs by means of spectral analysis of ultrasound echo signals. *Meat Science*, 69 (2) (2005) : 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.06.011>
- [13] J. L. Genisson, C. Cornu, S. Catheline, M. Fink & P. Portero, Human muscle hardness assessment during incremental isometric contraction using transient elastography. *Journal of Biomechanics*, 38 (7) (2005) : 1543–1550. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.07.013>
- [14] K. W. Nowak, Identification of meat types by ultrasonic methods. *Technical Sciences*, 18 (2) (2015) : 79–84. [Version électronique]. Disponible sur internet. URL : <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element/baztech-2ddd0161-a814-486c-b958-8734b4a42c48>
- [15] C. E. Byrne, D. Troy, D. & D.J. Buckley, Postmortem changes in muscle electrical properties of bovine M. longissimus dorsi and their relationship to meat quality attributes and pH fall. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00055-8](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00055-8) *Meat Science*, 54 (1) (2000) : 23–34.
- [16] H. J. Swatland, On-line monitoring of meat quality. In *Meat processing improving quality*. Woodhead Publishing Limited (2002) : 193–212. <https://doi.org/10.1533/9781855736665.2.193>
- [17] J. L. Damez, S. Clerjon, S. Abouekaram & J. Lepetit. Dielectric behavior of beef meat in the 1-1500 kHz range: Simulation with the Fricke/Cole-Cole model. *Meat Science*, 77 (4) (2007) : 512–519. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.04.028>
- [18] S. Clerjon, J. D. Daudin & J. L. Damez, Water activity and dielectric properties of gels in the frequency range 200 MHz–6 GHz. *Food Chemistry*, 82 (1) (2003) : 87–97. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00580-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00580-0)
- [19] D. Lorient, J. C. Lhuguenot & A. Voilley, La chromatographie Lorient, D Lhuguenot, J.C Voilley, A. In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*, Volume 2 : principes des techniques d'analyse. Paris: Lavoisier Tech & Doc (1991) : 74–114.
- [20] A. K. Subbaraj, Y. H. B. Kim, K. Fraser & M. M. Farouk, A hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry (HILIC-MS) based metabolomics study on colour stability of ovine meat. *Meat Science*, 117 (2) (2016) : 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.02.028>

- [21] J. AuTRAN, L'électrophorèse. In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 2 : principes des techniques d'analyse*. Paris: Lavoisier tech&doc. (1991) : 115–140.
- [22] L. Day & H. Brown, 2001. Detection of mechanically recovered chicken meat using capillary gel electrophoresis. *Meat Science*, 58 (1) (2001) : 31–37. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00127-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00127-3)
- [23] A. Buleon. Diffraction des Rayon X. In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 2 : principes des techniques d'analyse*. Paris: Lavoisier Tech & Doc (1991) : 252–259.
- [24] C. Kröger, C.M Bartle, J.G Est, R. W. Purchas & C. E. Devine, Meat tenderness evaluation using dual energy X-ray absorptiometry (DEXA). *Computers and Electronics in Agriculture*, 54 (2) (2006) : 93– 100. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2006.09.002>
- [25] J. L. Damez, & S. Clerjon. Quantifying and predicting meat and meat products quality attributes using electromagnetic waves: An overview. *Meat Science*, 95 (4) (2013) : 879–896. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.037>
- [26] P. Marel, 2017. Superior bone detection, SensorX poultry products, p.6.
- [27] D. N. Rutledge & D. Tome, 1991. La resonance magnetique nucléaire (RMN). In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 2 : principes des techniques d'analyse*. pp. 234–251.
- [28] L. Venturi, P. Rocculi, C. Cavani, G. Placucci, M. D. Rosa & M. A. Cremonini, 2007. Water absorption of freeze-dried meat at different water activities: A multianalytical approach using sorption isotherm, differential scanning calorimetry, and nuclear magnetic resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (26) (2007) : 10572–10578. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf072874b>
- [29] E. Micklander, B. Peshlov, P. P. Purslow, & S. B. Engelsen, NMR-cooking: monitoring the changes in meat during cooking by low-field H-1-NMR. *Trends in Food Science & Technology*, 13 (9–10) (2002) : 341–346. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00163-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00163-2)
- [30] H. C. Bertram, R. H. Andersen & H. J. Andersen, Development in myofibrillar water distribution of two pork qualities during 10-month freezer storage. *Meat Science*, 75 (1) (2007) : 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.06.020>
- [31] W. Jakes, A. Gerdova, M. Deferez, A. D. Watson, C. McCallum, E. Limer, I. J. Colquhoun, D. C. Williamsont & E. K. Kemsley, Authentication of beef versus horse meat using 60 MHz 1H NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 175 (5) (2015) : 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.110>
- [32] M. Mouaddab, L. Foucat, J. P. Donnat, J. P. Renou, J. M. M Bonny, Absolute quantification of Na+ bound fraction by double-quantum filtered Na-23 NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 189 (1) (2007) : 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2007.09.003>
- [33] U. Erikson, I. B. Standal, I. G. Aursand, E. Veliyulin & M. Aursand, Use of NMR in fish processing optimization: A review of recent progress. *Magnetic Resonance in Chemistry*., 50 (7) (2012) : 471–480. <https://doi.org/10.1002/mrc.3825>
- [34] I. K. Adzamlı, F. A. Jolesz, A. R. Bleier, R. V. Mulkern & T. Sandor, The effect of Gadolinium Dtpa on tissue water compartments in slow-twitch and fasttwitch rabbit muscles. *Magnetic Resonance in Medicine*., 11 (2) (1989) : 172–181. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910110205>
- [35] H. C. Bertram, S. J. Holdsworth, A. K. Whittaker & H. J. Andersen, Salt diffusion and distribution in meat studied by Na-23 nuclear magnetic resonance imaging and relaxometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*., 53 (20),(2005) : 7814–7818. <https://doi.org/10.1021/jf051017+>
- [36] M. L. H. Gruwel, Characterization of food stuffs using Magnetic Resonance Elastography. *Food Research International*, 43 (8) (2010) : 2087–2092. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.015>
- [37] K. I. Hildrum, J. P. Wold, H. S. Vegard, J. P. Renou & E. Dufour, New spectroscopic techniques for on-line monitoring of meat quality. In *Advanced technologies for meat processing*. New York: CRC Press. Taylor & Francis Group (2006) : 37–180.
- [38] C. Ducauze, 2003. *Fraudes alimentaires : approche réglementaire et méthodologie analytique*, Paris: Lavoisier Tech&Doc.
- [39] M. L. Colgrave, P. G. Allingham & A. Jones, Hydroxyproline quantification for the estimation of collagen in tissue using multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1212 (1–2) (2008) : 150–153. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.011>
- [40] J. Sadeghinezhad, B. Hajimohammadi, F. Izadi, F. Yarmahmoudi & R. Latorre, Evaluation of the Morphologic Method for the Detection of Animal and Herbal Content in Minced Meat. *Czech J. Food sciences*, 33 (6) (2015) : 564–569. <https://doi.org/10.17221/167/2015-CJFS>
- [41] C. W. Huck, Advances of infrared spectroscopy in natural product research. *Phytochemistry Letters*, 11 (2015) : 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.10.026>
- [42] D. Bertrand, & P. Robert, 1991. Spectroscopie de réflexion dans le proche infrarouge (SPIR). In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 2 : principes des techniques d'analyse*. Paris: Lavoisier Tech&Doc (1991) : 55–61.
- [43] A. H. Hoving Bolink, H. W. Vedder, J. W. M. Merks, W. J. H. De Klein, H. G. M. Reimert & R. Frankhuizen, Perspective of NIRS measurements early post mortem for prediction of pork quality. *Meat Science*, 69 (3) (2005) : 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.08.012>
- [42] S. Andres, I. Murray, E. A. Navajas, A. V. Fisher, N. R. Lambe, N.R.& L. Bunger, Prediction of sensory characteristics of lamb meat samples by near infrared reflectance spectroscopy. *Meat Science*, 76 (3) (2007) : 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.01.011>
- [45] U. Böcker, R. Ofstad, H. C. Bertram, B. Egelanddsdal & A. Kohler, Salt-induced changes in pork myofibrillar tissue investigated by FT-IR microspectroscopy and light microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (18) (2006) : 6733–6740. <https://doi.org/10.1021/jf060178q>
- [46] M. S. Ammor, A. Argyri, & G. J. E. Nychas, Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Science*, 81 (3) (2009) : 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.10.015>
- [47] R. Manoharan, Y. Wang & M. S. Feld, Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 52 (2) (1996) : 215–249. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(95\)01573-6](https://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01573-6)
- [48] U. Böcker, R. Ofstad, Z. Y. Wu, H. C. Bertram, G.D. Sockalingum, & M. Manfait, Revealing covariance structures in Fourier transform infrared and Raman microspectroscopy spectra: A study on pork muscle fiber tissue subjected to different processing parameters. *Applied Spectroscopy*, 61 (10) (2007) : 1032–1039. <https://doi.org/10.1366%2F000370207782217707>
- [49] H. Schmidt, R. Scheier & D. L. Hopkins, Preliminary investigation on the relationship of Raman spectra of sheep meat with shear force and cooking loss. *Meat Science*, 93 (1) (2013) : 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.08.019>
- [50] E. Rome, Light and X-ray diffraction studies of the filament lattice of glycerol-extracted rabbit Psoas muscle. *Journal of Molecular Biology*, 27 (3) (1967) : 591–602. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90061-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90061-7)
- [51] Y.L. Liu. & Y. R. Chen, Analysis of visible reflectance spectra of stored, cooked and diseased chicken meats. *Meat Science*, 58 (4) (2001) : 395–401. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00041-](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00041-)



- 9
- [52] J. J. Xia, E. P. Berg, J. W. Lee & G. Yao, Characterizing beef muscles with optical scattering and absorption coefficients in VIS--NIR region. *Meat Science*, 75 (1) (2007) : 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.07.002>
- [53] A. Driou, 1991. Autres techniques optiques et spectroscopiques. A :Techniques optique. In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 2 : principes des techniques d'analyse*. Paris: Lavoisier Tech&Doc (1991) : 43–61.
- [54] G. Linder & M. Guingamp, 1991. Techniques spectrométriques. In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 2 : principes des techniques d'analyse*. Paris: Lavoisier Tech& doc (1991) : 03–42.
- [55] N. Light, A. E. Champion, C. Voyle & A. J. Bailey, The role of epimysial, perimysial and endomysial collagen in determining texture in six bovine muscles. *Meat Science*, 13 (3) (1985) : 137–149. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(85\)90054-3](https://doi.org/10.1016/0309-1740(85)90054-3)
- [56] H. J. Swatland, Connective and adipose tissue detection by simultaneous fluorescence and reflectance measurements with an on-line meat probe . *Food Research International*, 33 (9) (2000) : 749–757. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00065-X)
- [57] E. Dufour, J. P. Francia, & E. Kane, Development of a rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of fish freshness. *Food Research International*, 36 (5) (2003) : 415–423. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00174-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00174-6)
- [58] C.M. Andersen & J. P. Wold, Fluorescence of muscle and connective tissue from cod and salmon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2) (2003) : 470–476. <https://doi.org/10.1021/jf020524d>
- [59] S. Clerjon, F. Peyrin, & J. Lepetit, Frontal UV-visible fluorescence polarization measurement for bovine meat ageing assessment. *Meat Science*, 88 (1) (2011) : 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.11.027>
- [60] R. Karoui & C. Blecker, Fluorescence spectroscopy measurement for quality assessment of food systems—A review. *Food and Bioprocess Technology*, 4 (3) (2011) : 364–386.
- [61] J. Adda & J. Le Quere, 1991. Technique physique, Spectrométrie de Masse. In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 2 : principes des techniques d'analyse*. Paris: Lavoisier Tech& doc (1991) : 282–303.
- [62] P. Le roux, 1991. Techniques biochimiques, L'analyse enzymatique. In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 2 : principes des techniques d'analyse*. Paris: Lavoisier Tech&Doc (1991) : 325–340.
- [63] N. Z. Ballin, Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86 (6) (2010) : 577–587. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.001>
- [64] J.L. Berger,1991. Techniques biochimiques ,L'analyse immunochimique. In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 2 : principes des techniques d'analyse*. Paris: Lavoisier Tech&Doc (1991) : 343–366.
- [65] A. T. Sherikar, J.B. Khot, B. M. Jayarao & S. R. Pillai, Use of species specific antisera to adrenal heat stable antigens for the identification of raw and cooked meats by agar gel diffusion and counter immunoelectrophoretic techniques. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 44 (1) (1988) : 63–73. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740440108>
- [66] M. M. Bhat, H. Jalal, P. A. Para, S. A. Bukhari, S. Ganguly, A. A. Bhat, R. Wakchaure & J. Qadri, Fraudulent Adulteration/Substitution of Meat: A Review. *International Journal of Recent Research and Applied Studies (IJRRAS)*, 2 (12) (2015) : 22–33. [Version électronique]. Disponible sur internet. URL : <http://ijrras.com/fraudulent-adulteration-substitution-of-meat-a-review/>
- [67] F. C. Chen & Y. H. P. Hsieh, Detection of Pork in Heat-Processed Meat Products by Monoclonal Antibody-Based ELISA. *Journal of AOAC International*, 83 (1) (2000) : 79–85.
- [68] A. Tasser, 1991. Techniques optiques, Techniques d'analyse d'image. In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 2 : principes des techniques d'analyse*. Paris: Lavoisier Tech&Doc (1991) : 62–73.
- [69] D. Guzek, D. Glabska & A. Wierzbicka, Analysis of Beef Topside RGB Components of Colour After Thermal Treatment Executed in the Steam-Convection Oven , on the Basis of fresh meat colour. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 57 (1) (2012) : 55–58. [Version original en Polonais]. Disponible sur internet. URL : [https://www.pimr.eu/wp-content/uploads/2019/05/2012\\_1\\_GGW.pdf](https://www.pimr.eu/wp-content/uploads/2019/05/2012_1_GGW.pdf)
- [70] N. Z. Ballin & R. Lametsch, Analytical methods for authentication of fresh vs . thawed meat – A review. *Meat Science*, 80 (12) (2008) : 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.12.024>
- [71] K. Shiranita, T. Miyajima & R. Takiyama, Determination of meat quality by texture analysis. *Pattern Recognition Letters*, 19 (14) (1998) : 1319–1324. [https://doi.org/10.1016/S0167-8655\(98\)00113-5](https://doi.org/10.1016/S0167-8655(98)00113-5)
- [72] C. J. Du & D. W. Sun, Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (5) (2004) : 230–249. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.006>
- [73] T. Brosnan & D. W. Sun, Improving quality inspection of food products by computer vision – A review. *Journal of Food Engineering*, 61 (1) (2004) : 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00183-3](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00183-3)
- [74] P. Jackman, D. W. Sun, C. J. Du, P. Allen & G. Downey, Prediction of beef eating quality from colour, marbling and wavelet texture features. *Meat Science*, 80 (4) (2008) : 1273–1281. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.06.001>
- [75] J. Li, J. Tan, F. A. A. Martz & H. Heymann1999. Image texture features as indicators of beef tenderness. *Meat Science*, 53 (1) (1999) : 17–22. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00031-5)
- [76] M. R. Chandraratne, S. Samarasinghe, D. Kulasiri, A. E. Bekhit & R. Bickerstaffe, Prediction of lamb tenderness using image surface texture features. *Journal of Food Engineering*, 77 (3) (2006) : 492–499. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.06.063>
- [77] X. Chen, B. Zheng & H. Liu, Optical and digital microscopic imaging techniques and applications in pathology. *Analytical Cellular Pathology*, 34 (1–2) (2011) : 5–18. <https://doi.org/10.3233/ACP-2011-0006>
- [78] M. B. Douglas, 2001. Fundamentals of light microscopy and electronic imaging. New York: Wiley-Liss.
- [79] J. R. Harris, 2006. Basic Electron Microscopy. In *Cell Biology P rotocols*. England: John Wiley & Sons (2006) : 21–50.
- [80] J. Sobotta & U. Welsch, 2004. Précis d'histologie: Cytologie, histologie, anatomie macroscopique. Edition Fr., Paris: Lavoisier EMinter.
- [81] A. L. Mescher, 2013. Junqueira's Basic Histology text and atlas 13th ed., USA: McGraw-Hill Education.
- [82] T. Bolumar, U. Bindrich, S. Toepfl, F. Toldrá & V. Heinz, Effect of electrohydraulic shockwave treatment on tenderness, muscle cathepsin and peptidase activities and microstructure of beef loin steaks from Holstein young bulls. *Meat Science*, 98 (7) (2014) : 759–765. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.024>
- [83] W. Liu & T. C. Lanier, Combined use of variable pressure scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy best reveal microstructure of comminuted meat gels. *LWT - Food Science and Technology*, 62 (2) (2015) : 1027–1033. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.001>
- [84] Y. Sato, T. Saito, K. Tsuchiya, M. Terauchi, H. Saito & M. Takeda, Electron energy-loss and soft X-ray emission

- spectroscopy of electronic structure of MgB<sub>4</sub>. *Journal of Solid State Chemistry*, 253 (3) (2017) : 58–62.  
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/500/19/192013>
- [85] E. Tomberg, Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*, 70 (9) (2005) : 493–508. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.11.021>
- [86] C. Qihe, H. Guoqing, J. Yingchun & N. Hui, Effects of elastase from a *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. *Food Chemistry*, 98 (4) (2006) : 624–629.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.043>
- [87] B. James & S. W. Yang, Testing meat tenderness using an in situ straining stage with variable pressure scanning electron microscopy. *Procedia Food Science*, 1 (2011) : 258–266.  
<https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.041>
- [88] P. García-Segovia, A. Andrés-Bello & J. Martínez-Monzó, Effect of cooking method on mechanical properties, color and structure of beef muscle (*M. pectoralis*). *Journal of Food Engineering*, 80 (3) (2007) : 813–821.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.07.010>
- [89] M. S. Yarmand & A. Homayouni, Quality and microstructural changes in goat meat during heat treatment. *Meat Science*, 86 (2) (2010) : 451–455. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.033>
- [90] L. C. Junqueira, J. Carneiro, & R. O. Kelley, 2001. *Histologie* 2<sup>nd</sup> ed., Italie: PCCIN.
- [91] B. Gerelt, Y. Ikeuchi & A. Suzuki, Meat tenderization by proteolytic enzymes after osmotic dehydration. *Meat Science*, 56 (3) (2000) : 311–318. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00060-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00060-7)
- [92] A. R. Sen, & N. Sharma, Effect of freezing and thawing on the histology and ultrastructure of buffalo muscle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17 (9) (2004) : 1291–1295.  
<https://doi.org/10.5713/ajas.2004.1291>
- [93] Y. N. Nakamura, M. Ando, M. Seoka, K. Kawasaki & Y. Tsukamasa, Changes in physical/chemical composition and histological properties of dorsal and ventral ordinary muscles of full-cycle cultured Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, during chilled storage. *Journal of Food Science*, 71 (2) (2006) : E45–E51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08896.x>
- [94] J. R. Lawrence, G. D. W. Swerhone, G. G. Leppard, T. Araki, T. X. Zhang, M. M. West & A. P. Hitchcock, Scanning transmission X-ray , laser scanning , and transmission electron microscopy mapping of the exopolymeric matrix of microbial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (9) (2003) : 5543–5554. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5543-5554.2003>
- [95] P. J. McClure, Microbiological hazard identification in the meat industry. In *Meat processing improving quality*. New York: CRC Press (2002) : 217–236.  
<https://doi.org/10.1533/9781855736443.3.157>
- [96] N. Cohen & H. Karib, Risque hygiénique lié à la présence des *Escherichia coli* dans les viandes et les produits carnés : Un réel problème de santé publique ? *Les technologies de laboratoire*, 1 (January 2006) (2006) : 4–9. [Version électronique]. Disponible sur internet. URL : <https://revues.imist.ma/index.php?journal=technolab&page=article&op=view&path%5B%5D=317>
- [97] G. J. E. Nychas, P.N. Skandamis, C. C. Tassou & K. P. Koutsoumanis, 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78 (1–2) ( ) : 77–89.
- [98] R. P. Fregonesi, R. G. Portes, A. M. M. Aguiar, L. C. Figueira, C. B. Gonçalves, V. Arthur, C. G. Lima, A. M. Fernandes & M. A. Trindade, Irradiated vacuum-packed lamb meat stored under refrigeration: Microbiology, physicochemical stability and sensory acceptance. *Meat Science*, 97 (2) (2014) : 151–155.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.01.026>
- [99] S. M. Syne, A. Ramsuhag & A. A. Adesiyun, Microbiological hazard analysis of ready to eat meats processed at a food plant in Trinidad, West Indies. *Infection Ecology & Epidemiology*, 3 (6) (2013) : 12. <https://dx.doi.org/10.3402%2Fiec.v3i0.20450>
- [100] E. B. Bingol & O. Ergun, Effects of modified atmosphere packaging (MAP) on the microbiological quality and shelf life of ostrich meat. *Meat Science*, 88 (4) (2011) : 774–785.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.03.013>  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.03.013>
- [101] D. I. Ellis, D. Broadhurst, D. B. Kell, J. J. Rowland & R. Goodarce, Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (6) (2002) : 2822–2828.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.060>. [Version électronique]. Disponible sur internet. URL : <https://aem.asm.org/content/68/6/2822.full>
- [102] I. Tomasevic J., Kuzmanović A., Anđelković M., Saračević M., Stojanović M. & Jekić I., The effects of mandatory HACCP implementation on microbiological indicators of process hygiene in meat processing and retail establishments in Serbia. *Meat Science*, 114 (1) (2016) : 54–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.008>
- [103] F. Kechrid, 2017. L'importance de One Health pour la sécurité alimentaire dans le monde et rôle majeur du vétérinaire. In *Espace vétérinaire Agérien*. Oran: EVA 12<sup>e</sup> édition, p. 3.
- [104] M. Vitalae, 2017. One Health approach to control infections, antimicrobial resistance and assure a major food safety. In *Espace vétérinaire Agérien*. Oran: EVA 12<sup>e</sup> édition, p. 5.
- [105] M. Boux, B. Carpentier, G. Durant & J. Y. Leveau, 1991. Techniques bactériologiques d'analyse chimique. In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*, Volume 2 : principes des techniques d'analyse. Paris: Lavoisier Tech&Doc (1991) : 367–378.
- [106] A. Di Pinto, V. T. Forte, M. C. Conversano & G. M. Tantillo, Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Control*, 16 (5) (2005) : 391–394.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.04.004>
- [107] S. Ghovvati, M. R. Nassiri, S. Z. Mirhoseini, A. Heravi Moussavi, & A. Javadmanesh, Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control*, 20 (8) (2009) : 696–699. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.002>
- [108] R. Farrokhi & R. J. Joozani, Identification of pork genome in commercial meat extracts for Halal authentication by SYBR green I real-time PCR. *International Journal of Food Science and Technology*, 46 (5) (2011) : 951–955.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02577.x>
- [109] V. P. Singh & N. Sachan, Meat species-Review. *Meat Science*, 1 (1) (2011) : 15–26. <http://dx.doi.org/10.3923/ijmeat.2011.15.26>
- [110] F. Sauvageot, 1991. Evaluation sensorielle. In : *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires*, Volume 2 : principes des techniques d'analyse. 2<sup>ème</sup> éd. Paris : Lavoisier Tech & Doc (1991) : 382–448.
- [111] R. G. Nute, 2002. Sensory analysis of meat. In *Meat processing improving quality*. pp. 175–190.
- [112] K. Nakyinsige, Y. B. C. Man & A. Q. Sazili, Halal authenticity issues in meat and meat products. *Meat Science*, 91 (3) (2012) : 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.015>
- [113] S. Malakauskiene, I. Alioniene, D. Dziugiene, V. Babrauskiene, C. Riedel, T. Adler & M. Malakauskas, Histological analysis for quality evaluation of cured meat. *Veterinarija ir zootechnika (Vet Med Zoot)*, 74 (96) (2016) : 23–26. [Version électronique]. Disponible sur internet. URL : <https://vetzoo.lsmuni.lt/data/vols/2016/74/pdf/malakauskiene.pdf>
- [114] B. E. Prayson, J.T. McMahon & R. A. Prayson, Applying morphologic techniques to evaluate hotdogs: what is in the hotdogs we eat? *Annals of Diagnostic Pathology*, 12 (2) (2008) : 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2007.04.012>
- [115] K. M. Jonker, J. J. H. C. Tilburg, G. H. Hägele & E. De Boer,



- Species identification in meat products using real-time PCR.  
Food Additives & Contaminants: Part A, 25 (5) (2008) : 527–533. <https://doi.org/10.1080/02652030701584041>
- [116] B. Macé, J. Costentin, A. Défossez & D. Felimann, 2008. Histologie, Bases fondamentales, Roumanille : Omniscience. 365 p. ISBN : 978-2-916097-17-6
- [117] R. Wayne, 2009. Light and Video Microscopy, USA: Academic Press, Elsevier.
- [118] K. Botka-petrak, A. Hraste, H. Luci, Z. Gottstein, D. Martina & S. Jakši, Petrak, Tomislav., Histological and chemical characteristics of mechanically deboned meat of broiler chickens. Veterinarski Arhiv, 81 (2) (2011) : 273–283. [Version électronique]. Disponible sur internet. URL : [https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id\\_clanak\\_jezik=100600&lang=en](https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=100600&lang=en).

Soumis le : 28/05/2020

Forme révisée acceptée le : 30/06/2021

Auteur Correspondant: [chyahia56@yahoo.fr](mailto:chyahia56@yahoo.fr)



**Revue  
Nature et Technologie**

<http://www.univ-chlef.dz/revuenatec>

ISSN : 1112-9778 – E-ISSN : 2437-0312

## Bilan de la première transplantation d'arbres de ficus (*Ficus retusa*) en Algérie

Yahia CHEBOUTI<sup>a,\*</sup>, Aissa MIHOUBI<sup>a</sup>, Kaddour MAAMAR-KOUADRI<sup>a</sup>, Nadjiba CHEBOUTI-MEZIOU<sup>b</sup>, Naima IFTICENE-HABANI<sup>c</sup>

<sup>a</sup> INRF-Baraki, Alger, Algérie

<sup>b</sup> Université M'hamed Bougara de Boumerdes. FS. Labo : LTDVP, Algérie

<sup>c</sup> Université d'Alger I, FSNV, Algérie

### Résumé

Le projet du tramway d'Alger a nécessité d'énormes aménagements urbains tout le long de son itinéraire dont le déplacement de 518 arbres centenaires de ficus (*Ficus retusa*) d'Hussein Dey (Alger-Est) vers plusieurs sites dans le centre Algérois. Cette vaste opération de transplantation, la première du genre en Algérie a été réalisée février 2009. Juste après, l'opération a été renouvelée à Oran en septembre. Cette opération s'inscrit en droite ligne pour la préservation du patrimoine forestier, qui est devenue une priorité pour les collectivités locales et un objectif pour le développement urbain. La réussite de l'opération de transplantation, permet de sauvegarder un bon nombre de grands arbres des centres urbains qui cherchent à s'aménager ou à s'urbaniser. Cette opération réalisée dans l'urgence, en plus de l'embellissement du réseau routier et l'amélioration du cadre de vie des citoyens, avait pour but la lutte contre la pollution urbaine et une diminution considérable des températures estivales. L'opération doit respecter rigoureusement les consignes strictes d'exécution et de chronologie des différentes opérations techniques d'extraction, de transport, de plantation et de suivi. Le bilan de l'opération de transplantation de ficus (*Ficus retusa*) fait ressortir un taux de réussite qui varie de 47 à 97 % selon les sites.

Mots-clés : Transplantation ; Ficus ; Alger ; Bilan ; Aménagement urbain ; Patrimoine.

### Report of the first transplantation of Ficus trees (*Ficus retusa*) in Algeria

### Abstract

The Algiers tram project required enormous urban development along its route, including the relocation of 518 hundred-year-old Ficus (*Ficus retusa*) trees from Hussein Dey (Algiers-East) to several sites in central Algiers. This vast transplant operation, the first of its kind in Algeria, carried out in February 2009. Immediately after, the operation was repeated in Oran in September. This operation is in line with the preservation of the forest heritage, which has become a priority for local communities and an objective for urban development. The success of the transplant operation makes it possible to save a good number of large trees in urban centres' seeking to develop or urbanize. This emergency operation led to a fight against urban pollution, the improvement of the road network, the considerable reduction in summer temperatures and the improvement of the living environment of citizens. The success of the operation must strictly adhere to the strict instructions for the execution and timing of the various technical operations of extraction, transport, planting and monitoring. The assessment of the ficus (*Ficus retusa*) transplantation operation shows a success rate that varies from 47 to 97% depending on the site.

Keywords: Transplantation; Ficus; Algiers; Assessment; Urban development; Heritage.

### 1. Introduction

Plusieurs ficus ont été introduits en Algérie en 1863 par Auguste HARDY<sup>1</sup> au niveau du jardin d'essai.

Actuellement, elle constitue la première espèce utilisée comme arbre d'alignement dans les grandes agglomérations d'Algérie. A Saidia au Maroc, Dardour et *al.* [1] notent que le *Ficus retusa* est l'espèce dominante en alignement sur les 28 espèces végétales identifiées. Ceci est dû essentiellement à son suivi aisé,

<sup>1</sup> (1818-1882) : Directeur du jardin d'acclimatation à Alger.  
[https://data.bnf.fr/fr/10471891/auguste\\_hardy/](https://data.bnf.fr/fr/10471891/auguste_hardy/)



Ceci est un document en libre accès selon les termes de [Creative Commons Attribution License CC-BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), ce qui permet de le partager, copier, reproduire, distribuer, communiquer, réutiliser ou de l'adapter avec l'obligation de créditer son auteur.

avec une facilité de taille de formation, supportant de longues périodes de sécheresse et ayant une croissance rapide.

Mimoune et Marouf [2] mentionnent son extension à Constantine depuis 2014. C'est un grand arbre taillé en parasols qui procure de la fraîcheur pendant les fortes chaleurs estivales et crée un microclimat local. Cette espèce supporte aisément les contraintes liées à la pollution urbaine et aux changements climatiques. Cependant, le facteur limitant de l'extension du ficus reste les basses températures, qui génèrent les gelées.

Si par le passé, le choix de l'abattage était prioritaire pour plusieurs raisons de management et d'économie, ce n'est plus le cas actuellement puisque l'alternative de transplantation existe.

Les agglomérations ont besoin de mettre en avant la nécessité de réaliser de vrais projets urbains accompagnés des préoccupations environnementales.

Les arbres filtrent et renouvellent l'air, jouent le rôle de lutte contre la désertification et contre l'érosion et tempèrent les variations climatiques dans les villes.

Sachant que la sauvegarde du patrimoine forestier exceptionnel et historique constitue l'un des objectifs de l'opération de transplantation, celle-ci contribue à l'enrichissement de la biodiversité paysagère des agglomérations en améliorant le cadre de vie.

Même si cette pratique est ancienne. Actuellement, des moyens mécaniques modernes facilitent davantage sa mise en œuvre et sa généralisation.

Cependant, les arbres contrarient parfois des projets d'urbanisme et il peut être tentant de les déplacer pour éviter de les abattre. Ainsi, les aménagistes intègrent, dans leurs projets, les grands arbres afin de préserver le paysage environnant.

L'arbre ne peut être considéré comme un mobilier urbain, mais un élément central de tout projet d'aménagement [3].



Photo 1 : Alignement d'arbres de *Ficus retusa* en 1940 près de la gare de Hussein Dey

D'où le grand intérêt à la gestion du patrimoine arboré, notamment en termes d'économie et d'environnement [4].

La présente étude fait suite au projet de réalisation du tramway d'Alger afin d'accompagner le transfert des arbres centenaires de *Ficus retusa* et de donner un bilan de l'opération de transplantation dans ses différents stades.

## 1. Matériel et méthodes

L'espèce *Ficus retusa* est originaire d'Indonésie, de la famille des Moraceae et est souvent considérée en tant que plante d'alignement et d'ornement.

Le choix du protocole retenu pour sa transplantation exige un respect strict de la chronologie des interventions pour garantir le succès de l'opération et qui nécessite une main d'œuvre qualifiée [5]. La transplantation s'est faite pendant le repos végétatif de façon à limiter le stress hydrique ; le mois de Novembre étant le plus favorable. En outre, les feuillus caducs sont transplantés de novembre à mars et les conifères de septembre à mars.

Les arbres adultes perdent leurs facultés de reprise beaucoup plus que les arbres jeunes. R. Durand [6] note que le pistachier fruitier de 3 ans perd jusqu'à 20 % de ces facultés lors de la transplantation.

A cette époque, le sol est généralement humide, ce qui permet au système racinaire de bien s'installer et de démarrer sa croissance dès les premières chaleurs du printemps.

La transplantation est une phase délicate, qui s'accompagne d'une période sensible appelée « crise de transplantation » [7]. Les périodes de gel et de pluie intense favorisent la nécrose des tissus du système racinaire et qui dégradent la motte.

### 1.1. Zone d'étude

La transplantation des arbres, objet de l'étude de *Ficus retusa* de la rue de Tripoli à Hussein-Dey (Alger-Est) vers cinq agglomérations d'Alger-Centre, a été réalisée entre février et Mars 2009. Les cinq sites de transplantation sont situés dans la zone Algéroise (figure 1).

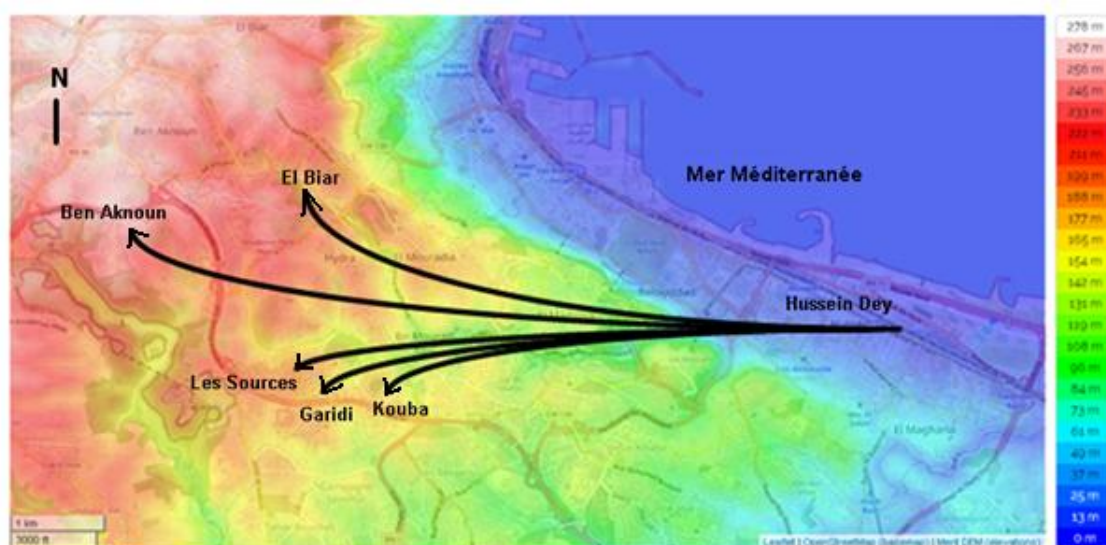


Figure 1 : Transfert du site d'enlèvement vers les sites de transplantation (image : <https://fr-fr.topographic-map.com/maps/z9f9/>)

Tableau 1  
Localisation du site d'enlèvement et des cinq sites de plantation

Sites	Localités	Longitude	Latitude	Altitude	Observation	Nombre
Enlèvement	Hussein Dey	03°06'00''E	36°44'31''N	7 m	Alignement (2 km)	518
	Kouba	03°04'44''E	36°43'06''N	69 m	Alignement et îlot	70
	Garidi	03°03'44''E	36°43'41''N	106 m	3 îlots	354
Plantation	Sources	03°03'52''E	36°43'56''N	126 m	Alignement	37
	El-Biar	03°02'29''E	36°45'43''N	160 m	Alignement	20
	Ben-Aknoun	03°00'55''E	36°45'03''N	251 m	Alignement et îlot	37

L'altitude varie de 07 m à Hussein Dey et 251 m à Ben Aknoun (tableau 1). L'étage bioclimatique de la zone d'étude est le subhumide à hiver frais et relativement pluvieux et un été chaud et humide, ce qui caractérise le climat méditerranéen. La pluviométrie peut atteindre 700 mm/an.

La zone d'enlèvement est représentée par une longue artère de 2200 m constituée d'un alignement de 518 arbres de ficus sains âgés approximativement de 80 années, espacés de 4 mètres et ayant une hauteur de 4,5 m, taillés en parasol.

Cependant, les sites de plantation sont hétéroclites, soit qu'il s'agit d'îlots nouvellement constitués de remblai ou de regarnis et d'un alignement qui varie de 20 pieds à El Biar à 37 pieds aux Sources. Les aménagements d'accueil sont quelquefois approximatifs, il s'agit bien souvent de simples potets superficiels de quelques dizaines de cm de profondeur (El Biar).

## 1.2. Itinéraire Technique de la transplantation

L'opération de transplantation comporte deux phases distinctes (tableau 2).

La première phase de pré-transplantation englobe les opérations d'exécution. Ce sont les actions d'élagage, de cernage, de transfert et de plombage qui sont réalisées dans la journée.

La post-transplantation, est la phase de suivi et d'entretien. Elle s'étale sur plusieurs mois et concerne les opérations d'arrosage, de tuteurage et de surveillance phytosanitaire des arbres transplantés.

Tableau 2  
Facteurs composant des deux phases

Phases	Facteurs
PHASE I : Pré-transplantation	Elagage
	Cernage
	Transfert
	Plombage
	Repos végétatif
	Ouverture de potets
PHASE II : Post-Transplantation	Nature du sol
	Age
	Arrosage
	Tuteurage
	Suivi sanitaire

### 1.2.1. Ouverture des potets (Photo 2)

Les potets ont été ouverts en fonction des dimensions des futs, suffisamment profonds pour assurer la stabilité de l'arbre.



Photo 2 : Alignement des arbres de ficus et ouverture des potets (Garidi)

### 1.2.2. Elagage de la couronne

L'élagage limite l'évaporation en réduisant la masse foliaire. Une légère ramification permet le maintien de la circulation de la sève.

Les racines aériennes molles et ligneuses du ficus s'adaptent à l'environnement chaud et humide. Elles sont capables d'absorber l'eau par osmose dans des conditions d'humidité élevée et à surmonter les périodes de stress hydrique (photo 3) [8, 9].



Photo 3 : Les racines aériennes du ficus (Les Sources)

### 1.2.3. Cernage des racines

Un système racinaire important (chevelu, réserves) favorise la reprise de l'arbre transplanté. Ainsi, le cernage, qui consiste à couper les racines d'un arbre à une certaine distance tout autour du tronc, ce qui permet le développement système racinaire sous forme d'un chevelu racinaire pourvu de poils absorbants à l'endroit même de la coupure, près de la base du tronc.

Les sections coupées lors du cernage sont recouvertes avec un produit cicatrisant pour éviter les risques d'infection car, une mauvaise qualité des systèmes racinaires, constitue l'une des causes majeures de mortalité des arbres transplantés [6],

Dans certains cas, le cernage est renforcé d'un dispositif de protection en toile de jute ou d'un maillage métallique ou plastique, permettant de protéger la motte contre l'émiettement et le dessèchement.

La taille des racines avant la transplantation favorise la croissance de nouvelles racines immédiatement après la transplantation [10, 11]. Le contact racine-sol n'est peut-être pas le facteur le plus influent pour déterminer le succès de la transplantation chez ces *Ficus* spp. En effet, il arrive que, dix années après la transplantation, les racines soient encore cantonnées dans la motte [12] (Photo 4).





Photo 4 : Cernage des racines (Hussein Dey)

#### 1.2.4. Transfert

Le transport s'effectuait en fin ou en début de journée pour éviter les expositions aux aléas climatiques. Les arbres sont alors inclinés pour permettre le franchissement des ponts et des ouvrages d'art. La transplantation d'arbres est ainsi possible sur de grandes distances. Néanmoins, les arbres doivent être protégés contre le dessèchement.

#### 1.2.5. Tuteurage des arbres

Le tuteurage est réalisé par Haubans, avec 3 à 5 câbles, surtout dans les zones exposées aux grand vend ou en pente. Les liens sont détendus de façon à ne pas blesser les tiges [13].

#### 1.2.6. Plombage

Un arrosage abondant ou plombage est réalisé immédiatement après la plantation. Pour une meilleure adhérence, le plombage a pour vocation de mettre le sol en place autour du système racinaire et de combler les poches d'air pouvant exister [14] (Photo 5).

L'arrosage régulier améliore la survie après la transplantation [15, 16]. Un programme d'arrosage est établi en fonction des conditions climatiques :

- 1<sup>ère</sup> année : jusqu'à 20 arrosages
- 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> année : jusqu'à 10 arrosages



Photo 5 : Plombage à l'eau (Ben Aknoun)

#### 1.2.7. Suivi sanitaire des arbres

Le suivi sanitaire est impératif pour la réussite de l'ensemble de l'opération de la transplantation [14]. La surveillance doit être stricte, car un arbre affaibli permet l'installation de parasites et d'insectes.

Pari ces ravageurs, on rencontre le scolyte, insecte xylophage de l'ordre des coléoptères qui creusent des galeries à l'intérieur de l'arbre ce qui aboutit à son dépérissement (Photo 6), le psylle du ficus (*Macrophoma gladiata*), insecte suceur des feuilles<sup>2</sup> [17, 18] (Photo 7) ; ou encore le thrips (*Gynaikothrips ficorum*) de la galle foliaire de ficus très répandue dans l'Algérois et ailleurs [19] (Photo 8).



Photo 6 : Dépérissement du ficus attaqué par un scolytes (Garidi)

<sup>2</sup> Signalé pour la première fois à Mostaganem (Nord-ouest de l'Algérie) en 2017.





Photo 7 : Dégât du Psylle (*Macrophomotoma gladiata*) sur les feuilles de ficus



Photo 8 : Galle foliaire de ficus due aux Thrips (*Gynaikothrips ficorum*) qui occasionne de la

## 2. Résultats et discussions

Afin de qualifier l'opération de transplantation, l'analyse des correspondances multiple, ou ACM, a été faite sur l'ensemble des variables étudiées mettant en relief d'une part le taux de réussite par rapport aux sites étudiés, et d'autre part les variables qui influencent ce taux par site en utilisant le logiciel XLSTAT<sup>3</sup>® [20].

Cette analyse a permis de faire ressortir deux groupes distincts et un groupe intermédiaire.

Les taux de réussite de la transplantation par site sont donnés dans le tableau 3 avec une appréciation sur la qualité de chacun des sites afin d'avoir un aperçu sur la conduite de l'opération. Dans le tableau 4 sont mentionnés les facteurs qui influencent l'opération de transplantation par ordre d'importance pour chaque site.

Le tableau 5 répertorie les causes caractérisant l'importance de chaque facteur sur l'opération de

transplantation sur une échelle variant de très favorable (A) à très défavorable (E).

### 2.1. Taux de réussite par site

Les taux de réussite enregistrés pour l'opération de la transplantation, varient de 47 à 97 % suivant les sites (tableau 3). Pour les taux les plus bas, les carences observées concernent essentiellement, le manque de suivi d'arrosage, et à un degré moindre, des potets superficiels réalisés sur sol peu profond et de faibles dimensions (Photo 9).



Photo 9 : Potet superficiel sur dalle

Le non-respect du cernage des racines et une absence totale de terre réduit le taux de réussite de l'opération (Photo 10).



Photo 10 : Absence de motte (Kouba)

Cependant, quand les conditions de transplantation sont réunies au niveau de l'extraction, du transport, de la rapidité de la plantation et enfin de l'arrosage, alors le taux de réussite atteint 97 %, ce qui représente une transplantation parfaite.

<sup>3</sup> Logiciel d'analyse de données et de statistique pour Microsoft Excel  
(©. <https://www.xlstat.com/fr/>)

- Le site de Kouba : Les conditions de préparation et d'exécution ont été parfaites, ceci a permis d'obtenir un taux de réussite excellent.
- L'aménagement d'un nouveau réseau routier a nécessité l'enlèvement de 13 arbres ce qui a réduit considérablement le taux de réussite de 18 %.
- Le site de Garidi : Composé de trois îlots, le manque d'arrosage régulier a fait chuter le taux de réussite à 47 %. Actuellement, une opération de regarnis est en cours de réalisation, afin de combler les vides.
- Le site des sources : Un résultat excellent de 97 %, où tous les moyens étaient réunis et les conditions largement respectées notamment le suivi d'arrosage et le respect des dimensions des potets.
- Le site d'El Biar : Le taux moyen de réussite atteint avec 55 % s'explique essentiellement par la faible profondeur des potets.
- Le site de Ben Aknoun : Dans ce site, il y a les arbres plantés au niveau de l'esplanade qui ont été bien pris en charge. Par contre, les arbres situés au niveau du parking ont été laissés sans arrosage, où seuls trois arbres sur treize ont survécu.

Tableau 3  
Taux de réussite de la transplantation par site

Sites	Nombre d'arbres en 2009	Nombre d'arbres en 2020	Taux de réussite (%)	Observations
Kouba	70	65*	92	Excellent
Garidi	354	168	47	Moyen
Ben Aknoun	37	26	70	Très bon
Les Sources	37	36	97	Excellent
El Biar	20	11	55	Moyen
Global	518	316	61	

\* : 13 arbres ont été enlevés pour des travaux d'aménagement routier sur le site de Kouba. Moyen = (40-59 %) ; Très bon = (60-79 %) et Excellent = (80-100 %)

## 2.2. Facteurs influençant la transplantation

Les facteurs influençant la réussite de la transplantation ont été répertoriés par ordre d'importance selon le tableau 4.

Tableau 4  
Facteurs influençant la transplantation par ordre d'importance

Phases	Facteurs	Influence sur la transplantation	
		Présence	Absence
PHASE I : Pré-transplantation	Elagage	Facilité de transport	Encombrant
	Cernage	Maintien de la motte	Dessèchement de la motte
	Repos végétatif	En dormance	En végétation
	Transfert	Réduction des stress	Augmentation des stress
	Plombage	Contact parfait	Grande porosité
	Potet	Stabilité et bon mélange	Encrage insuffisant
	Qualité du sol	Riche en nutriments	Sol superficiel pauvre
PHASE II : Post-transplantation	Age	Bonne reprise arbres jeunes	Difficulté de reprise arbres âgés
	Arrosage	Humidification du substrat	Dessèchement des plants
	Tuteurage	Maintien des arbres	Chute des arbres
	Suivi sanitaire	Evite les complications	Multiplication des risques

Le respect des règles des deux phases détermine le succès de la transplantation. Les arbres ayant une circonférence de tronc supérieure à 60 cm ont une reprise beaucoup plus délicate alors que la

transplantation d'arbres matures ou en phase de vieillissement est très risquée. Pour les arbres âgés, elles peuvent avoir moins d'allongement des pousses,

une photosynthèse avec une conductance stomatique plus faible et des taux de transpiration plus faibles [21].

Seul l'élagage a été géré de manière identique pour l'ensemble des arbres. Les autres paramètres, comme un potet superficiel ou l'absence de motte, ont été gérés de manière hétéroclite.

De même, d'autres facteurs, tels qu'une mauvaise exécution du cernage, la lenteur dans le transfert des arbres et le manque de plombage et d'arrosage, ont fait que les résultats l'opération de transplantation soient de mauvaise qualité.

### 2.3. Influence des facteurs de transplantation sur le taux de réussite par site

Les travaux d'exécution sur l'ensemble les sites ont été conduits de manière hétéroclite. Seuls Kouba et des sources ont bénéficié de conditions optimales.

L'appréciation de chaque paramètre identifié ci-dessus donne un aperçu quant à la qualité de la transplantation pour chaque site et son degré de priorisation. L'intensité des paramètres varie de très favorable (A) à très défavorable (E) (tableau 5). Le suivi attentif de ces arbres nouvellement transplantés est essentiel, car le pic de mortalité a souvent lieu 2 ou 3 ans après la plantation, lorsque l'arbre a épuisé toutes ses réserves [14].

Après douze années de suivi, Il est nécessaire d'avoir un œil critique sur l'évolution de la transplantation pour se prononcer sur le succès de l'opération notamment du point de vue phytosanitaire.

Tableau 5  
Influence des facteurs de transplantation sur le taux de réussite par site

Paramètres	Sites				
	Kouba	Garidi	Ben Aknoun	Les sources	El Biar
Elagage	A	A	A	A	A
Cernage	A	A	D	A	E
Repos végétatif	A	B	D	D	B
Transfert rapide	A	E	E	A	B
Plombage	B	B	B	B	D
Arrosage	B	D	D	B	E
Qualité du sol	A	A	A	A	D
Ouverture potet	A	A	A	A	E
Tuteurage	D	D	D	B	D
Suivi sanitaire	A	E	E	A	D
Age	C	C	C	C	C

(A) : Facteur très favorable ; (B) : Facteur favorable ; C : sans influence  
(D) : Facteur défavorable et (E) : Facteur très défavorable.

### 2.4. Analyse statistique des données

Comme cité auparavant, la méthode statistique choisie dans le cadre de cette étude est l'ACM.

Pour reprendre son principe général, elle consiste à :

« ... résumer l'information contenu dans un grand nombre de variables afin de faciliter l'interprétation des corrélations existantes entre ces différentes variables [et observations] [...] ».

L'idée générale est la suivante. L'ensemble des individus peut être représenté dans un espace à plusieurs dimensions où chaque axe représente les différentes variables utilisées pour décrire chaque individu. [...]. Un tel nuage de points est aussi difficile à interpréter que de lire directement le

fichier de données [...]. Afin de mieux représenter ce nuage de points, on va procéder à un changement de systèmes de coordonnées. Les individus seront dès lors projetés et représentés sur un nouveau système d'axe [...] choisie de telle manière que la majorité des variations soit concentrées sur les premiers axes [...]»<sup>4</sup>.

Ainsi, pour notre cas, comme l'indique la figure 2, l'inertie portée par chacun des axes de l'ACM répartie sur 4 axes F1, F2, F3 et F4 renferment pratiquement 100 % de l'information. On remarque que les deux premiers axes représentent une bonne description de la

<sup>4</sup> <http://larmarange.github.io/analyse-R/analyse-des-correspondances-multiples.html>

dispersion des taux de réussite par site puisque leur inertie cumulée est de l'ordre de 77,93 %.

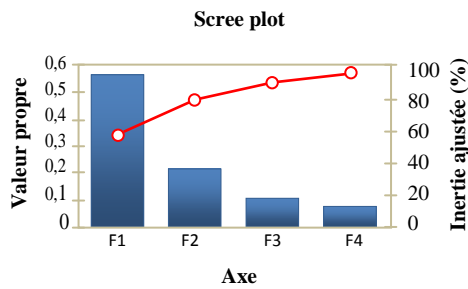


Figure 2 : Valeurs propres de la transplantation

Ainsi, La projection des variables caractérisant le taux de réussite et les sites exploités, identifiés sur le plan 1 et 2 de la ci-contre (figure 3), montre la formation de 02 groupes principaux caractérisés par un regroupement au centre, avec un groupe intermédiaire sur l'abscisse positive des Axes F1 et F2.

Les résultats obtenus par similarité sont semblables à ceux obtenus par dissimilarité (figure 4). Ainsi, pour l'interprétation de nos résultats, on se contentera d'adopter ceux trouvés par dissimilarité en raison de leurs concordances avec ceux de l'ACM.

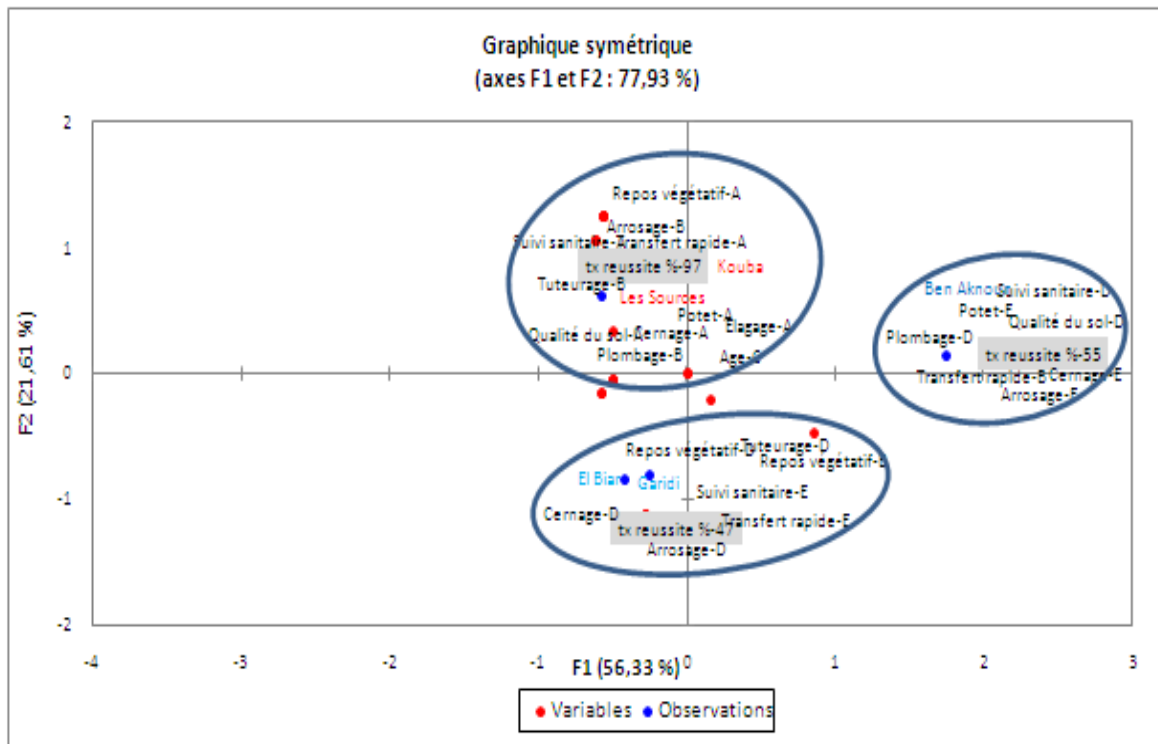


Figure 3 : Diagramme d'ordination dérivé de l'ACM sur le plan de projection (axes F1 et F2)

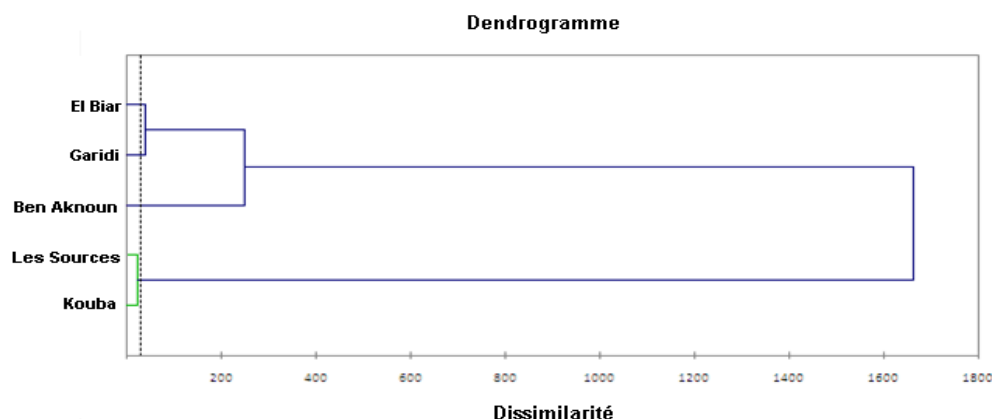


Figure 4 : Dendrogramme de classification de la transplantation

Avec un investissement aussi important dans la transplantation, la création des conditions de récupération des arbres concernés est essentielle. La capacité d'un arbre à répondre avec succès aux changements dus à la transplantation diminue généralement avec son âge.

La transplantation, notamment en milieu urbain, est confrontée à la difficulté de l'évolution de l'arbre, due à l'appauvrissement du sol et aux polluants atmosphériques.

Certains arbres semblent mieux supporter la transplantation que d'autres. Les oliviers, les platanes et les micocouliers seraient les plus résistants, alors que les robiniers, les paulownias, les sophoras et les tilleuls la supporteraient beaucoup moins bien [12]. Pour cela, les arbres doivent être en très bon état, vigoureux et sans infections phytosanitaires.

Il est donc important de prévoir un programme de traitement phytosanitaire préventif contre les insectes, tels que cité plus-haut (scolytes, Thrips, Psylle), et autres maladies sur la population de *Ficus retusa* dans un paysage urbain [12,19]

La transplantation réussie dépend, en partie, de la rapidité avec laquelle une nouvelle croissance racinaire peut être initiée et développée dans le sol et à l'extérieur de la motte pour rétablir l'équilibre hydrique [22].

A contrario, d'autres opérations du même genre ont été faites à travers le pays avec le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et le Washingtonia (*Washingtonia filifera*) mais n'ont pas été couronnées du même succès. Les conditions ayant accompagné la conduite des travaux n'étant pas été totalement réunies, en plus des délais de réalisation trop courts.

### 3. Conclusion

Le *Ficus retusa* est devenu la première espèce d'alignement et d'ornement des villes en Algérie, vu son adaptation, son esthétique et la facilité de son entretien.

De nos jours, il représente une solution prisée dans la composition des forêts urbaines et peut être considéré comme un élément privilégié dans la lutte contre le réchauffement climatique.

Malgré les délais restreints pour sa réalisation, l'opération de sa transplantation à Alger a été conduite avec succès dans son ensemble grâce notamment à la plasticité de l'espèce. Quant aux arbres n'ayant pas survécu à l'opération de transplantation, ils ont pu trouver une seconde vie pour devenir un élément de décoration artistique, de l'axe autoroutier de la capitale, apprécié des usagers.

Cette première opération de transplantation peut être considérée comme un outil de préservation des ressources naturelles et d'aménagement urbain, ce qui doit encourager les collectivités locales et les intervenants à généraliser son adoption pour la conservation de la biodiversité végétale.

### Références

- [1] Dardour M., Daroui E-A., Boukroute A., Kouddane N-E. et Berrichi A., Inventaire et état sanitaire des arbres d'alignement de la ville de Saïdia (Maroc oriental), Revue Nature & Technologie. C-Sciences de l'Environnement, 10 (2014) : 02-09. Disponible en ligne. [https://www.univ-chlef.dz/revuenatec/Issue\\_10\\_Art\\_C\\_01.pdf](https://www.univ-chlef.dz/revuenatec/Issue_10_Art_C_01.pdf) (Consulté le 10-03-2020)



- [2] Mimoune R. et Marouf N., « *Adaptation de Ficus retusa à la variabilité thermique dans la région de Constantine* » Master Université de Constantine. 2018. 69 p. Disponible sur URL : <https://bu.umc.edu.dz/master/index.php> (Consulté le 04-05-2020)
- [3] C-M. Gillig, C. Bourgerie et N. Amann - L'arbre en milieu urbain : conception et réalisation de plantations. Edition Infolio. 2008. 216 p. ISBN : 978-2-88474-036-4
- [4] S. Le Gourrierec - « *L'arbre en ville : le paysagiste concepteur face aux contraintes du projet urbain* ». Thèse d'ingénieur des sciences agricoles. Université d'Angers. 2012. 61 p. Disponibles en ligne. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00739439/document> (Consulté le 25-03-2020)
- [5] M-H. Sedra - Le Palmier dattier base de la mise en valeur des oasis au Maroc. Techniques phoénicoles et Création d'oasis. Ed. INRA-Maroc. 2004. 265 p. Disponibles en ligne. <https://www.inra.org.ma/sites/default/files/publications/ouvrages/palmierdattier.pdf> (Consulté le 11-06-2020)
- [6] R. Durand - Les plantations, les principales causes d'échec. Arboretum national des Barres. 2005. 7 p.
- [7] M. Pryor and G. Watson - Mature tree transplanting: Science supports best management practice. *Arboricultural Journal*, 38 (1) (2016) : 26. Disponible en ligne. <https://core.ac.uk/download/pdf/45606746.pdf> (Consulté le 10-03-2020)
- [8] S. Arpacı and B-E. Ak - An investigation on the determination of transplanting success and growth in some *Pistacia* spp. seedlings transplanted in field conditions. *CIHEAM Cahiers Options Méditerranéennes*, 56 (2001) : 209-213. Disponible sur URL : <https://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=1600177>
- [9] C. Bellini, D-I. Pacurar and I. Perrone - Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Rev. Plant Biol.*, 65 (2014): 639-666. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035645>
- [10] L-Y. Liu, X-Z. Fu, Z-Q. Luo and X-X. Guo - Gas exchange characteristics of aerial root and affecting factors of *Ficus microcarpa* L. f. (in Chinese). *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 19 (2011): 45-50. Résumé sur URL : [http://jtsb.ijournals.cn/jtsb\\_en/ch/reader/view\\_abstract.aspx?flag=1&file\\_no=2603&journal\\_id=jtsb\\_cn](http://jtsb.ijournals.cn/jtsb_en/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=2603&journal_id=jtsb_cn)
- [11] E-F. Gilman, A. Stodola and M-D. Marshall - Root pruning but not irrigation in the nursery affects live-oak root balls and digging survival. *Journal of Environmental Horticulture*, 20 (2002): 122-126. <https://doi.org/10.24266/0738-2898-20.2.122>
- [12] E-F. Gilman and P. Anderson - Root pruning and transplant success for Cathedral Oak live oaks. *Journal of Environmental Horticulture*, 24 (2006) : 13-17. Disponible en ligne. <https://hort.ifas.ufl.edu/woody/documents/articles/EFG0502.pdf> (Consulté le 23-05-2020)
- [13] Y. Haddad et A. Bonnardot - La transplantation des gros arbres. Ed. CAUE 77 (2007) : 7. Disponibles sur site. URL : <https://fr.calameo.com/caue77/read/0059881814cbdd8c27350> (Consulté le 25-06-2020)
- [14] A. Bonnardot - Plantation et entretien des jeunes arbres, l'entretien des jeunes plantations. Ed. CAUE. 2002. 37-39. Disponible sur site. URL : <https://fr.calameo.com/caue77/read/005988181ff90faa3cce8> (Consulté le 11-05-2020)
- [15] A. Bonnardot - Plantation et entretien des jeunes arbres, planter dans les règles de l'art. Ed. CAUE. 77 (2001) : 21-25. Disponible sur site URL : <https://fr.calameo.com/caue77/read/00598818186d736966b41> (Consulté le 18-04-2020)
- [16] A-L. Shober, K-A. Moore, C. Wiese, S-M. Scheiber, E-F. Gilman, M. Paz and S. Vyapari - Post transplant irrigation frequency affects growth of container-grown sweet *viburnum* in three hardiness zones. *Hort. Science*, 44 (2009): 1683-1687. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.6.1683>
- [17] C-L. Wiese, A-L. Shober, E-F. Gilman, M. Paz, K-A. Moore, S.M. Scheiber and S. Vyapari - Effects of irrigation frequency during establishment on growth of *Ilex cornuta* 'Burfordii Nana' and *Pittosporum tobira* 'Variegata'. *HortScience*, 44 (2009) : 1438-1443. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.5.1438>
- [18] Y. Guenaoui et D. Ouvrard - Une nouvelle espèce de psylle découverte sur *Ficus* en Algérie. *PHYTOMA* 691 (2016) : 7-9. [http://www.phytoma-ldv.com/article-24130-Une\\_nouvelle\\_espece\\_de\\_psylle\\_decouverte\\_en\\_Algerie](http://www.phytoma-ldv.com/article-24130-Une_nouvelle_espece_de_psylle_decouverte_en_Algerie) (Consulté le 17-03-2020)
- [19] B. Beladis, H. Bendoumia, A. Khemila, N. Baba Aissa et S. Doumandji - Biodiversité des opophages sur *Ficus retusa* (Moraceae) dans l'Algérois. Journées Nationales : Biodiversité animale, dégâts et lutte. ENSA Alger. 2017. 1p.
- [20] Kh. Ziouani, A. Benzehra and L. Saharaoui - Population fluctuations of *Gynaikothrips ficorum* (Marchal, 1908) (*Thysanoptera, Tubulifera*) and natural enemies on leaf gall of *Ficus retusa* in Algeria. *Arxius de Miscel·lània, Zoològica*, 17(2019) : 59-71. <https://doi.org/10.32800/amz.2019.17.0059>
- [21] A. Baccini - Statistique descriptive multidimensionnelle. Institut de mathématiques de Toulouse, 2010. 27-32
- [22] D-M. Lauderdale, C-H. Gilliam, Eakes D-J., Keever G-J. and Chappelka A-H., - Tree transplant size influences post-transplant growth, gas exchange, and leaf water potential of 'October Glory' red maple. *Journal of Environmental Horticulture*, 13 (1995): 178-181. <https://doi.org/10.24266/0738-2898-13.4.178>
- [23] R. Webb - Moving mature banyan trees in Hong Kong. *Arboricultural Journal*, 19 (4) (1995): 339-347. <https://doi.org/10.1080/03071375.1995.9747079>



Soumis le : 22/10/2020

Forme révisée accepté le : 26/04/2021

Auteur Correspondant: [laaribya.s@ucd.ac.ma](mailto:laaribya.s@ucd.ac.ma)



**Revue  
Nature et Technologie**

<http://www.univ-chlef.dz/revuenatec>

ISSN : 1112-9778 – E-ISSN : 2437-0312

# Modélisation par l'entropie maximale de l'habitat potentiel du cèdre de l'atlas au Maroc (*Cedrus atlantica Manetti*)

Said LAARIBYA<sup>a,\*</sup> et Assmaa ALAOUI<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Recomposition de l'Espace et Développement Durable (LREDD) - Département de géographie - Université Chouaib Doukkali Avenue Jabran Khalil Jabran B.P 299-24000- El Jadida, Maroc.

<sup>b</sup>Laboratoire de Biotechnologie et Valorisation des Ressources Naturelles (LBVRN)- Université Ibn Zohr -Faculté des sciences - B.P 8106 Cité Dakhla- Agadir, Maroc

## Résumé

Le cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica*) est une espèce emblématique du Maroc, classée par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) dans la liste rouge des espèces en voie de disparition. La détermination de son aire potentielle sous les conditions climatiques actuelles est une étape indispensable pour planifier et assurer sa conservation. Nous avons eu recours à la modélisation de la distribution de l'aire potentielle au Maroc par l'utilisation de l'approche d'entropie maximale « MaxEnt ». Le modèle développé est d'excellente qualité (AUC=0,967). Les variables les plus significatifs conditionnant la distribution du cèdre de l'Atlas, sous les conditions climatiques actuelles, sont la précipitation du trimestre le plus sec, les précipitations du mois le plus sec, la température moyenne annuelle et l'humidité relative. Le modèle développé a permis d'établir la première carte de l'aire potentielle de zones appropriées du cèdre de l'Atlas du Maroc. Les résultats obtenus guideront les gestionnaires à identifier les sites favorables pour la réhabilitation du cèdre de l'Atlas menacé d'extinction.

Mots-clés : *Cedrus atlantica* ; Aire potentielle ; MaxEnt ; Variables bioclimatiques ; Entropie maximale, Climat.

## Modelling potential habitats for the Atlas cedar (*Cedrus atlantica Manetti*) in Morocco using the maximum entropy model

### Abstract

The Atlas cedar (*Cedrus atlantica*) is an emblematic species of Morocco, classified by the International Union for the Conservation of Nature (IUCN) in the red list of endangered species. Determining its potential area under current climatic conditions is an essential step in planning and ensuring its conservation. In this paper, we applied the maximum-entropy algorithm (MaxEnt) to predict the current and potential distribution of the Atlas cedar in order to provide a basis for its conservation. The adjusted model had an excellent predictive quality (AUC = 0.967). The most significant variables influencing the distribution of Atlas cedar, under current climatic conditions, are the precipitation in the driest quarter, precipitation in the driest month, average annual temperature and relative humidity. The model developed made it possible to establish the first map of the suitable potential area of the Atlas cedar in Morocco. The results obtained will guide managers to identify favorable sites for the rehabilitation of the Atlas cedar threatened with extinction.

Keywords: *Cedrus atlantica*; Potential area; MaxEnt; Bioclimatic variables; Maximum entropy; Climate

### 1. Introduction

La diversité des conditions climatiques et écologiques du Maroc ainsi que sa position de rencontre entre la flore européenne, saharienne et macaronésienne en font un véritable carrefour floristique d'une diversité et d'une complexité incontestable. De cette diversité, résulte une grande richesse floristique et faunistique des espaces forestiers qui couvrent près de 9 millions

d'hectares, soit un taux de couvert de 12,7 % du territoire national et un taux moyen de boisement de 8 % [1].

Parmi les essences forestières du Maroc, le cèdre de l'Atlas est l'essence noble emblématique des montagnes de l'Atlas et du Rif, appréciée pour ses valeurs technologiques, écologiques et biogéographiques. Sur le plan économique, une grande partie de familles riveraines vivent directement des ressources offertes par



Ceci est un document en libre accès selon les termes de [Creative Commons Attribution License CC-BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), ce qui permet de le partager, copier, reproduire, distribuer, communiquer, réutiliser ou de l'adapter avec l'obligation de créditer son auteur.

les cédraies : bois de feu, bois de construction, parcours etc.... Sur le plan écologique, le cèdre organise des écosystèmes forestiers très importants. Il occupe une place remarquable, sinon au premier rang dans le paysage forestier marocain. Quant à sa valeur biogéographique, elle est liée au fait qu'il représente chez nous un genre ancien dont l'apparition remonte au Crétacé inférieur [2].

Le cèdre de l'Atlas est une espèce montagnarde, occupe des surfaces d'importance inégale et forme spontanément un seul bloc géographique en Afrique du Nord représenté par l'Atlas marocain (130.000 ha), le Rif marocain (15.000 ha) et l'Atlas algérien (40.000 ha) [3].

Au Maroc, le cèdre de l'Atlas a fait l'objet de plusieurs études bioécologiques et phytosociologiques [4-11]. Toutefois, jusqu'à présent aucune étude n'a mis en relief l'aire potentielle de distribution du cèdre de l'Atlas au Maroc.

Malgré son inscription, en 2016, au réseau mondial des réserves de biosphère), la cédraie marocaine affiche une tendance régressive aussi bien dans le temps que dans l'espace. L'[Union internationale pour la conservation de la nature](https://www.iucn.org/fr) (UICN)<sup>1</sup> l'a introduit dans sa liste rouge des espèces en voie de disparition [12].

La gestion durable et la conservation des écosystèmes au cèdre de l'Atlas du Maroc dans le contexte du changement climatique actuel nécessitent des perceptions scientifiques ciblées et une analyse spatiale permettant de formuler et mettre en œuvre une stratégie bien efficace. La connaissance de l'aire potentielle de distribution de l'espèce, ainsi que l'identification des facteurs environnementaux qui la conditionnent est une étape inévitable qui peut fournir des informations cruciales.

L'objectif de ce travail est de prédire l'habitat et la distribution spatiale du cèdre de l'Atlas du Maroc, en vue de sa conservation. L'algorithme d'entropie maximale (MaxEnt)<sup>2</sup> a été utilisé car il est considéré comme étant l'un des plus efficaces pour la modélisation de la répartition spatiale des espèces.

<sup>1</sup> <https://www.iucn.org/fr>

<sup>2</sup>Un modèle de Maximum d'Entropie (MaxEnt) : est un classifieur probabiliste linéaire et discriminant. À chaque individu est associé une probabilité d'appartenance à chacune des classes (dont la somme est 1). Voir :

[https://web.stanford.edu/~hastie/Papers/maxent\\_explained.pdf](https://web.stanford.edu/~hastie/Papers/maxent_explained.pdf)

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Zone d'étude : cèdre de l'Atlas au Maroc

La présente étude est réalisée à l'échelle du bloc Marocain constitué par toute la zone de répartition actuelle du cèdre de l'Atlas au Maroc (Figure1). Les forêts de cèdre s'étagent en altitude entre le montagnard méditerranéen et l'oroméditerranéen et peuvent être observées aussi dans le supra méditerranéen [13]. En effet, au Maroc on distingue les cédraies du Moyen Atlas central (120.000 ha), les cédraies du Moyen Atlas oriental (23.000 ha), les cédraies du Haut Atlas oriental (26.000 ha), les cédraies du Rif (15.000 ha) et les cédraies du Tazekka (850 ha).

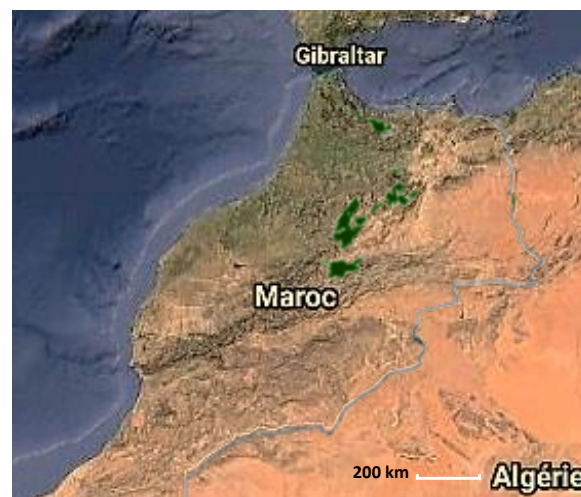


Figure 1 – Localisation des peuplements de cèdre de l'Atlas au Maroc

- Les cédraies du Moyen Atlas central : se développent sur substrats calcaire ou dolomitique du Lias et du Jurassique et sur basalte du Quaternaire. Deux groupes se distinguent par leur structure géomorphologique : le groupe du Causse moyen atlasique tabulaire au nord et le groupe du Moyen Atlas plissé au sud constitué par des reliefs plus individualisés [14].
- Les cédraies du Moyen Atlas oriental : s'individualisent en petits îlots dans les massifs du Bou Iblane, de Taffert et de Tamtroucht au Nord et dans les massifs de Bou Naceur au sud, sur substrat dolomitique ou marno-calcaire du Toarcien- Aolenien.
- Les cédraies du Haut Atlas oriental : se répartissent sur les versants Nord de Jbel Layachi et du Jbel Masker

sur marno-schistes calcaires. Ces massifs présentent des analogies climatiques et édaphiques avec les cédraies de Bou-Iblane [15].

- Les cédraies du Rif : se développent sur calcaire en mélange avec le sapin du Maroc (*Abies maroccana*) et sur des substrats quartzeux-schisteux de la nappe de Kétama ou sur des substrats gréseux de la nappe de Tizirène [16].
- Les cédraies du Tazekka : se développent sur schistes primaires non calcaires, présentant beaucoup d'affinités avec celles du Rif située à quelques centaines de km à vol d'oiseau 23.000 ha [16].

## 2.2. Données et méthodes

Pour déterminer l'aire potentielle du cèdre de l'Atlas du Maroc, on a eu recours à la version 3.4.1 du programme de modélisation de la distribution spatiale basée sur le principe d'entropie maximale «MaxEnt» qui consiste à choisir pour un phénomène donné une distribution qui maximise l'entropie. Cette méthode permet d'établir une relation entre la niche écologique de l'espèce et les variables environnementales susceptibles de conditionner sa présence [17]. Elle représente un outil important de prédiction en écologie de la conservation [18].

Compte tenu de l'occurrence d'une espèce donnée et des variables explicatives, une carte de pertinence de la distribution potentielle peut être réalisée [19].

Dans notre cas nous avons utilisé un échantillon de points de présence du cèdre de l'Atlas du Maroc (données d'occurrence) et les rasters des variables environnementales qui couvrent tout le Maroc.

Nous avons choisi un échantillon aléatoire et simple mille deux cent cinquante et un (1251) points de présence du cèdre de l'Atlas du Maroc à partir de la base de données de l'Inventaire Forestier National. Par la suite nous avons effectué des sorties de vérification sur 125 points de présence choisis selon une grille représentative de notre échantillon de départ (soit 10 % de notre échantillon de départ) afin d'éviter tout oubli ou confusion avec les autres espèces.

Les données climatiques de base concernant la période 1970 à 2000, ont été extraits sous forme Raster de la version 2.1 de la base de [WorldClim](http://www.worldclim.org)<sup>3</sup>, catalogue de données de températures et de pluviométrie à

l'échelle mondiale, recueillies à une résolution de 30 arc-secondes au sol "≈1 km<sup>2</sup>/pixel" [20].

Pour pousser davantage la modélisation de l'aire du cèdre au Maroc, au lieu des 19 variables bioclimatiques utilisées dans ce genre de modélisation, nous avons eu recours à 24 variables environnementales et indices synthétiques méditerranéens pour modéliser la probabilité de présence du cèdre de l'Atlas du Maroc (Tableau1) : Dix-neuf (19) variables bioclimatiques les plus reliées aux aspects physiologiques de la croissance des plantes, trois (03) variables topographiques : l'altitude, l'exposition et la pente qui, selon la documentation, ont un effet sur la distribution du cèdre de l'Atlas du Maroc. Deux (02) autres indices qui agissent sur la distribution des espèces dans le contexte du climat méditerranéen : l'indice bioclimatique d'Emberger (Equation 1) et l'humidité relative (Equations 2 et 3). Compte tenu de leur indisponibilité, les données du sol n'ont pas été prise en compte dans le model.

Afin de tenir compte de l'évapotranspiration, Emberger [21] a induit l'amplitude thermique (M-m) qui a l'avantage d'exprimer indirectement le degré de continentalité et de l'humidité atmosphérique. Cet auteur estime dans son quotient pluviométrique (Q2) que la vie d'une espèce végétale se déroule entre deux moyennes thermiques extrêmes. Pour une station donnée, l'amplitude thermique (M-m) exprime bien le degré de continentalité.

$$Q2 = \frac{2000 P}{M2 - m2} \quad (1)$$

Q2 = Coefficient d'Emberger modifié par Sauvage en 1963

P = Pluviométrie moyenne annuelle (mm)

M = Moyenne des maxima thermiques du mois le plus chaud en degré Kelvin (°k)

m = Moyenne des minima thermiques du mois le plus froid en degré kelvin (°k)

Humidité relative (Hr) :

$$Hr = \frac{P_{vap}}{P_{sat}} \quad (2)$$

avec l'équation :

$$P_{sat} = 0,61078 * \text{Exp} \left( \frac{17,27 * T}{273,3 + T} \right) \quad (3)$$

L'humidité relative (Hr) a été déduite en se basant sur le rapport entre la pression partielle de la vapeur

<sup>3</sup> <http://www.worldclim.org>

d'eau contenue dans l'air "Pvap" et la pression de vapeur saturante "Psat" à la même température. Le calcul du paramètre "Psat" a nécessité le recours à la formule de Tetens donnée par l'équation (3) telle qu'elle est reprise par Monteith *et al.* [23].

Les données relatives aux températures moyennes annuelles "T", à la pression partielle de la vapeur d'eau "Pvap", à l'altitude et aux variables bioclimatiques extraites de la base WorldClim [24].

Tableau 1  
Variables utilisées dans le processus de modélisation

Code	Variables environnementales	Unité
Bio1	Température moyenne annuelle	°C
Bio2	Plage diurne moyenne (moyenne mensuelle (Temp max - temp min))	°C
Bio3	Isothermalité (BIO2 / BIO7) ( $\times 100$ )	%
Bio4	Saisonnalité de la température	°C
Bio5	Température maximale du mois le plus chaud	°C
Bio6	Température minimale du mois le plus froid	°C
Bio7	Plage annuelle de température (BIO5-BIO6)	°C
Bio8	Température moyenne du trimestre le plus humide	°C
Bio9	Température moyenne du trimestre le plus sec	°C
Bio10	Température moyenne du trimestre le plus chaud	°C
Bio11	Température moyenne du trimestre le plus froid	°C
Bio12	Précipitations annuelles	mm
Bio13	Précipitation du mois le plus humide	mm
Bio14	Précipitation du mois le plus sec	mm
Bio15	Saisonnalité des précipitations	%
Bio16	Précipitation du trimestre le plus humide	mm
Bio17	Précipitation du trimestre le plus sec	mm
Bio18	Précipitation du trimestre le plus chaud	mm
Bio19	Précipitation du trimestre le plus froid	mm
Q-Emberger	Quotient d'Emberger	---
Hr	Humidité relative	%
Exp	Exposition	----
P	Pente	°
Alt	Altitude	m

### 2.3. Modélisation avec MaxEnt

1. La Courbe Caractéristique d'Opération dite ROC (Receiving Operator Characteristic) [22] et l'AUC (Air Under Curve : Aire sous la courbe ROC), qui est un seuil qui évalue la capacité prédictive du modèle ; Plus la valeur d'AUC est proche d'un, plus on est éloigné d'un modèle aléatoire. Les valeurs de l'AUC sont interprétées comme suit [2] : le modèle est « Excellent » si  $AUC > 0,90$  ; « Bon » si  $0,80 < AUC \leq 0,90$  ; « Acceptable » si  $0,70 < AUC \leq 0,80$  ; « Mauvais » si  $0,60 < AUC \leq 0,70$  et « Invalide » si  $AUC \leq 0,6$ .

Pour valider le modèle estimé nous avons utilisé une partie de l'échantillon (soit 30 %) (Test data).

Le test de jackknife permet la détermination du pouvoir prédictif de chaque variable et l'identification celles qui contribuent le plus à la génération du modèle de distribution produit par MaxEnt.

2. Le modèle MaxEnt pour le cèdre de l'Atlas est une représentation de la probabilité de présence de l'espèce à chaque pixel dans la zone d'étude. Ce modèle permet de produire la carte de distribution du cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica*) en se basant sur une classification des résultats en deux intervalles de probabilité de présence "P", définis principalement par un seuil "S" retenu. Ce seuil (Threshold) est relatif à une présence d'entraînement au 10<sup>ème</sup> centile (10 percentiles training présence), représentant la probabilité que 90 % des points de présence tombent dans cette aire potentielle [25].

Pour réaliser la cartographie nécessaire, nous avons utilisé le logiciel « Arcgis »<sup>4</sup>, version 10.4.1

<sup>4</sup> Système informatique composé de différentes plateformes qui permettent aux utilisateurs SIG de collaborer et de partager l'information géographique. <https://www.arcgis.com/index.html>

### 3. Résultats

#### 3.1. Performance du modèle développé

La valeur de AUC de l'aire sous la courbe ROC, qui mesure la précision de prédiction du modèle, est 0,967

(Figure 2) ce qui confirme l'excellence de la modélisation qu'on a réalisé et indique la performance et la robustesse du modèle choisi pour la prédiction de l'aire potentielle du cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica*) au Maroc.

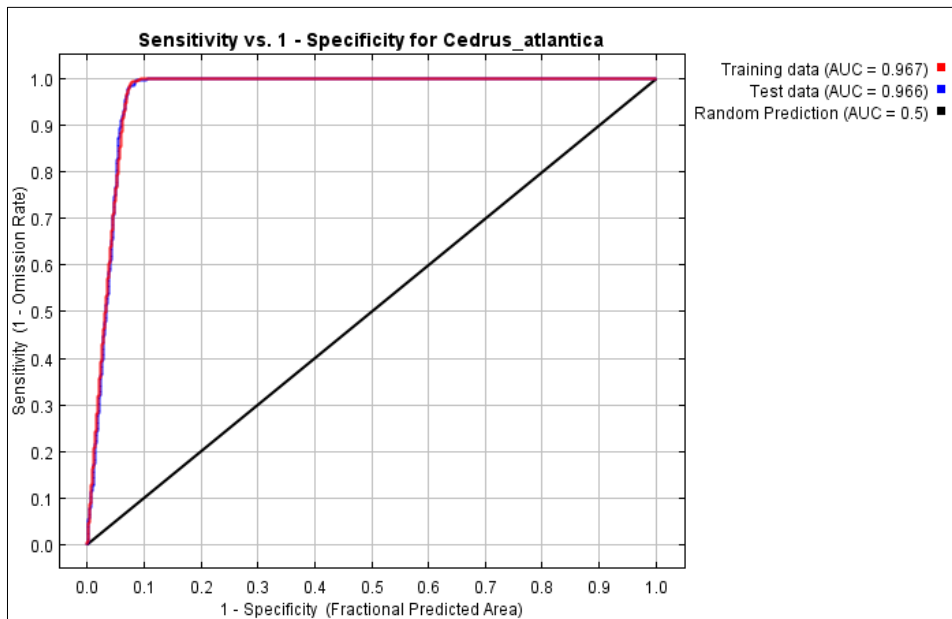


Figure 2 – Résultat du calcul de l'AUC, Aire Sous la Courbe Caractéristique d'Opération (ROC).

#### 3.2. Contribution relative des variables

Les résultats du test jackknife (Tableau2) révèlent que les principales variables qui ont le plus d'influence sur la présence du cèdre de l'Atlas au Maroc sont la Précipitations du trimestre le plus sec (bio-17), Précipitations du mois le plus sec (bio-14), Température moyenne du trimestre le plus sec (bio-9) et l'Altitude (Alt) avec respectivement 71,3 % ; 9,9 % ; 4,3 % et 3,3 % de contribution.

L'influence de ces variables est également évaluée par un autre paramètre statistique : l'importance de la permutation (Tableau 2) qui permet de dégager les variables provoquant une forte réduction dans le pouvoir prédictif du modèle lorsqu'ils sont omis.

Le test de jackknife fait ressortir que la variable environnementale qui entraîne une forte réduction (soit 18,1 %) du pouvoir prédictif du modèle lorsqu'elle est omise est l'humidité relative (Hr). La variable environnementale qui entraîne le meilleur gain (35,7 %) lorsqu'elle est utilisée isolément dans le modèle est la

température moyenne annuelle (Bio1). Ces deux variables semblent donc avoir plus d'informations explicatives sur la distribution du cèdre de l'Atlas comme le montre le tableau 2 et les résultats du test jackknife (Figure 3).

Ainsi, la combinaison des résultats du tableau 2 et de la figure 3 révèle que les précipitations du trimestre le plus sec (bio-17), les précipitations du mois le plus sec (bio-14), la température moyenne annuelle (Bio1) et l'humidité relative moyenne annuelle (HR) sont donc les variables qui influencent le plus le modèle. Les autres variables environnementales ont une faible contribution à la prédiction du modèle en question.



Tableau 2  
Contributions relatives et importance de la permutation en (%) des variables obtenus par le test Jackknife

Variable	Pourcentage de contribution	Importance de permutation
Bio17	71,3	9
Bio14	9,9	0,5
Bio9	4,3	3,7
Alt	3,3	0
Bio10	1,9	0
Bio11	1,7	0
Bio1	1,5	35,7
Hr	1,4	18,1
Bio19	1	8,6
Q-Emberger	0,6	0,8
Bio7	0,5	0,1
Bio3	0,5	10,2
Bio15	0,5	0,1
Bio5	0,4	0,6
Bio2	0,4	0,9
Bio6	0,3	0,2
Bio12	0,1	0,1
Bio16	0,1	0,3
P	0,1	0,1
Bio8	0,1	7
Bio13	0,1	3,9
Expo	0	0
Bio18	0	0
Bio4	0	0

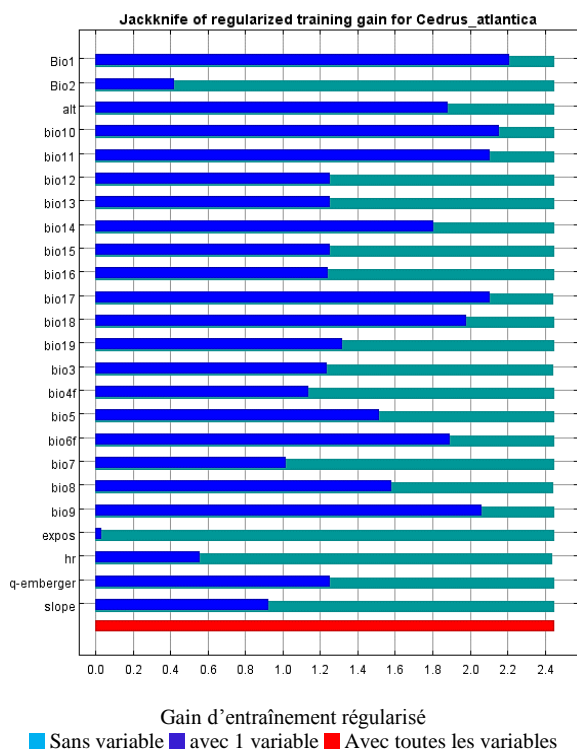


Figure 3 – Résultats du test Jackknife sur la contribution des variables sélectionnées à la prédiction de l’aire de distribution du cèdre de l’Atlas.

### 1.1. Cartographie de l’aire potentielle du cèdre de l’Atlas au Maroc

La méthode de modélisation utilisée et complétée par le travail cartographique, nous a permis de réaliser la première carte de l’aire potentielle de distribution du cèdre de l’Atlas au Maroc. Tenant compte du seuil relatif à une présence d’entraînement au 10<sup>ème</sup> centile. Ce seuil "S" retenu représentant la probabilité que 90 % des points de présence tombent dans cette aire potentielle.

La superficie actuelle du cèdre de l’Atlas su Maroc cartographiée est de l’ordre de 138.691 hectares. Les zones prédites (modélisées) favorables à l’installation du cèdre de l’Atlas du Maroc couvrent quant à eux 770.605 ha y compris les zones où l’espèce est actuellement présente (Figure4).

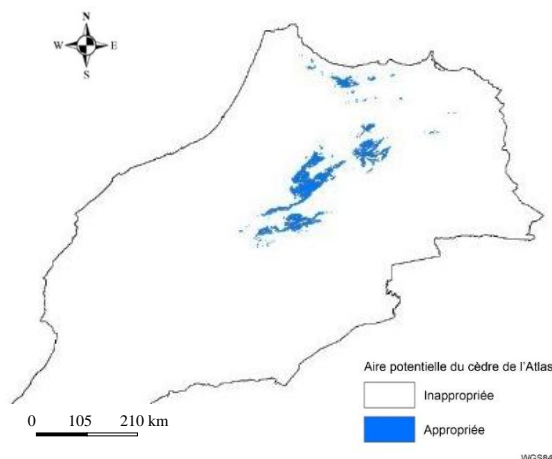


Figure 4 – Aire potentielle du cèdre de l’Atlas au Maroc (partie Nord Maroc).

Aussi, la superposition de l’aire de répartition actuelle du cèdre de l’Atlas à son aire potentielle prédite (Figure 5), nous a permis de déceler un surplus de 631.914 ha (soit une augmentation prévisionnelle de +455 %).

Mokrim *et al.* [9] ont trouvé une superficie potentielle de 961.510 ha chose qui confirme davantage les possibilités d’extension et de développement du cèdre de l’Atlas au Maroc.



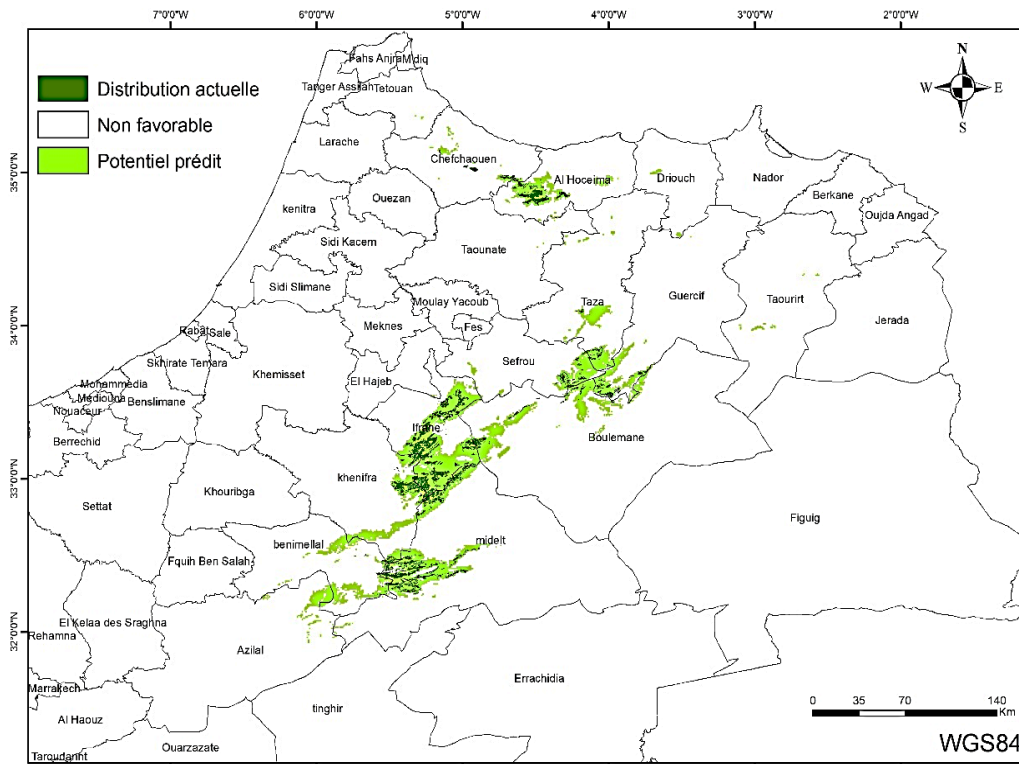


Figure 5 – Comparaison de la répartition actuelle avec l'aire potentielle prédite du cèdre de l'Atlas au Maroc.

## 2. Discussion

La modélisation de la distribution spatiale révèle que les précipitations du trimestre le plus sec (bio-17), Précipitations du mois le plus sec (bio-14), la température moyenne annuelle (Bio1) et l'humidité relative moyenne annuelle (HR) sont les variables qui influencent le plus dans la répartition actuelle du cèdre de l'Atlas au Maroc. L'espèce est absente dans les zones arides et semi arides où les précipitations sont faibles et les températures sont élevées et qui constituent un facteur limitant pour le cèdre de l'Atlas au Maroc. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs études qui stipulent que les variables climatiques jouent un rôle de première importance dans la distribution du cèdre de l'Atlas au Maroc [4,7].

Les courbes de réponses écologiques des variables ayant la plus grande importance montrent que la présence du cèdre de l'Atlas est optimale dans les zones où il y a plus de précipitation durant le trimestre le plus sec (bio-7) et celle des précipitations du mois le plus sec (bio-14) tandis que la température moyenne annuelle (Bio1) affiche des valeurs faibles. En effet, dans les conditions climatiques actuelles, les précipitations et leur variabilité constituent le facteur le plus important

de la distribution du cèdre de l'Atlas et sa croissance. Pour ce qui est du sol, la profondeur du sol et le substrat basaltique stimule positivement l'accroissement du cèdre de l'Atlas mieux que le calcaire [7].

Le cèdre individualise des peuplements dans les zones montagneuses froides principalement en ambiance bioclimatique subhumide, humide et perhumide, sous étage froid et très froid. Les cédraies d'altitude situées entre 2.200 et 2.500 m s'individualisent dans la variance extrêmement froide au Moyen Atlas et au Haut Atlas. Ce résultat confirme le fait que ce sont les paramètres climatiques, tels que la température et les précipitations, affectent le plus la distribution des espèces [27].

Mis à part l'altitude, les variables géotopographiques (exposition et pente) à la lumière des autres variables climatiques, ont très faiblement contribué à la prédiction du modèle et sont donc très peu significatives. Cependant, tenant compte de l'étroite relation de la variabilité spatiale des facteurs climatiques avec les facteurs géo-topographiques, on considère que l'influence de ces derniers sur la distribution de cèdre de l'Atlas est indirecte.

La superficie actuelle cartographiée du cèdre de l'Atlas au Maroc est de l'ordre de 138.691 ha tandis que

l'aire de distribution potentielle modélisée, représente 770.605 ha soit un surplus de 631.914 ha (+ 455 %) par rapport à son habitat actuel. Ce résultat témoigne d'une part, la régression de la superficie qu'occupait le cèdre de l'Atlas dans le passé, suite aux pressions humaines et pastorales, et révèle d'autre part, la possibilité de reconstitution de son habitat dans les conditions climatiques actuelles par sa reconstitution à l'échelle de son aire potentielle prédite.

La faisabilité de cette approche n'est pas à démontrer et permet, en perspectives, la modélisation du potentiel de distribution avec d'autres paramètres tels que la pédologie et la géomorphologie de l'espace.

### 3. Conclusion

Le cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica*), est une espèce emblématique qui a subi une forte dégradation et une réduction de sa répartition dans le temps. Elle est à présent classée par l'UICN dans la liste des espèces en danger.

Le modèle MaxEnt développé (AUC = 0,967) a permis de délimiter l'aire potentielle qui représente un gain de plus 425 % par rapport à la situation actuelle du cèdre de l'Atlas du Maroc. En effet, le présent travail fournit la première carte de l'aire de distribution potentielle du cèdre de l'Atlas au Maroc dans le contexte des données climatiques actuelles.

Dans les conditions climatiques actuelles, les précipitations du trimestre le plus sec, les précipitations du mois le plus sec, la température moyenne annuelle et l'humidité relative moyenne annuelle sont les descripteurs qui influencent le plus l'aire de répartition du cèdre de l'Atlas au Maroc.

Cette étude originale pour cette espèce emblématique servira de base pour toute planification stratégique de conservation de la biodiversité et de gestion durable du cèdre de l'Atlas au Maroc.

### Références

- [1] IFN (2005 et 2020). Données de l'Inventaire Forestier National du Maroc. Haut-Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification. (Non publié).
- [2] Emberger I. (1938). Les arbres du Maroc et comment les reconnaître - Paris, Larose, 1938, 317p. (OCOLC)555273964. Disponible en ligne : <http://www.abhatoo.net.ma/maalama-archives/archives-textuelles/l/sciences-et-technologies/sciences-exactes-et-naturelles/sciences-biologiques/phytologie-botanique/les-arbres-du-maroc-et-comment-les-reconnaitre>
- [3] Lahssini S., Hajib S., Lahlaoui H., Mharzi alaoui H., Khattabi A., Modelling spatial distribution of the Carob Tree (*Ceratonia siliqua*) in Azilal Province, Morocco. J. Geogr. Geol., 7 (4) (2015) : 33-44. <http://dx.doi.org/10.5539/jgg.v7n4p33>
- [4] Achhal A., Akabli O., Barbero M., Benabid A., M'Hirit O., Peyre C., Quezel P., Rivas-martinez S., A propos de la valeur bioclimatique et dynamique de quelques essences forestières au Maroc, Ecologia Mediterranea, 5 (1980) : 211-249. [Version HTML]. [https://www.persee.fr/doc/ecmed\\_0153-8756\\_1979\\_num\\_5\\_1\\_960](https://www.persee.fr/doc/ecmed_0153-8756_1979_num_5_1_960)
- [5] Et-tobi M., (2006). « Approche multidimensionnelle des relations (état sanitaire- station – sylviculture) pour l'étude du dépérissement des cédraies (*Cedrus atlantica* Man.) au Moyen Atlas en vue d'élaborer un modèle sylvicole de prévention phytosanitaire ». Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Agronomiques, I.A.V. Hassan II, Rabat, Maroc, 168 pages.
- [6] Ezzahiri M., Benghazi B. Synthèse de quelques résultats sur la régénération naturelle du cèdre de l'Atlas au Moyen Atlas (Maroc), Sci. Change. Planét. / Sécheresse, 11 (2000) : 79–84.
- [7] Laaribya S., Belghazi B., Dynamique et accroissement radial du Cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica*) – Cas de la forêt d'Azrou (Maroc), Revue Nature et Technologie, B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 14/ Janvier 2016, Pages 19 à 32. Disponible en ligne : [https://www.univ-chlef.dz/revuenatec/issue-14/Article\\_B/Article361.pdf](https://www.univ-chlef.dz/revuenatec/issue-14/Article_B/Article361.pdf) (Consulté le 11/10/2020).
- [8] Lepoutre B., Recherches sur les conditions édaphiques de régénération des cédraies marocaines, Ann. Rech. For. au Maroc, 6.6 (1961) : 01-183.
- [9] Moukrim S., Lahssini S., Rifai N., Menzou K., Mharzi-Alaoui H., Labbaci A., Rhazi M., Wahby I., El Madihi M., Rhazi L., Modélisation de la distribution potentielle de *Cedrus atlantica* Manetti au Maroc et impacts du changement climatique. Bois et Forêts des Tropiques, 344 (2020) : 3-16. <https://doi.org/10.19182/bf2019.344.a31888>.
- [10] Terrab A., Paun O., Talavera S., Tremetsberger K., Arista M., Stuessy T.F. (2006) – Genetic diversity and population structure in natural populations of Moroccan Atlas Cedar (*Cedrus atlantica*; Pinaceae) determined with CPSSR markers. Am. J. Bot. 93, 1274–1280. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.9.1274>
- [11] Till C., Guiot J., Reconstruction of precipitation in Morocco Since 1100 A.D. Based on *Cedrus atlantica* tree-ring widths, Quat. Res., 33 (1990) : 337–351. [https://doi.org/10.1016/0033-5894\(90\)90060-X](https://doi.org/10.1016/0033-5894(90)90060-X)
- [12] IUCN (2017) –The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-1. Disponible en ligne : <http://www.iucnredlist.org>. (Consulté le 03/10/2020)
- [13] Till C (1985). « Recherches dendrochronologiques sur le cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica*) au Maroc », Thèse d'état, Fac. Sci. Louvain la Neuve, Belgique.
- [14] M'Hirit O., Le cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* Manetti), présentation générale et état des connaissances à travers le réseau Silva mediterranea « le Cèdre », Ann. Rech. Forest., 27 (spécial), 1 (1994) : 3-21. Disponible en ligne : <http://www.fao.org/3/AH002F/AH002F00.pdf> (Consulté le 07/09/2020)
- [15] Emberger L (1939) : Aperçu général sur la végétation du Maroc. Commentaire de la carte phytocéologique du Maroc 1 :1.500.0000. Mémoire hors série de la Société des sciences naturelles du Maroc. p.11. [version imprimée].
- [16] M'Hirit O (1982). « Etude écologique et forestière des cédraies du Rif marocain. Essai sur une approche multidimensionnelle de la phytocéologie et de la productivité du cèdre ». Thèse de Doctorat es Science, Univ. Dr. Eco. Sci., Aix-Marseille, 436 pages.
- [17] Xavier S., Maarten Z., (2012). Manuel de formation à l'analyse spatiale de la diversité et de la distribution des plantes. Bioersity International, Rome, Italie. 186 pp. ISBN 978-92-9043-917-2

- [18] Phillips S., Anderson P., Schapire R., Maximum entropy modeling of species geographic distributions, *Ecol. Model.*, 190 (3-4) (2006): 231-259. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026>
- [19] Elith J., Leathwick JR., Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 40 (2009) : 677-697. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120159>
- [20] Fick S.E., Hijmans R.J., WorldClim 2 : nouvelles surfaces climatiques de résolution spatiale de 1 km pour les zones terrestres mondiales, *International Journal of Climatology*, 37(2017) (12): 4302-4315. <https://doi.org/10.1002/joc.5086>
- [21] Emberger L., Un projet de classification des climats du point de vue phytogéographique, *Bull. Soc. Nat. Toulouse*, 77 (1942) : 97-124. ISSN : 0758-4113. Disponible sur : <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k65553575/f101.image.r=Emberger> (Consulté le 09/01/2021)
- [22] Hanley J., Mcneil B., The meaning and use of the area under a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve, *Radiology*, 143 (1982) : 29-36. <https://doi.org/10.1148/radiology.143.1.7063747>
- [23] Monteith, J.L. & Unsworth, M.H. (2007), *Principles of Environmental Physics*. Third ed. Academic Press, Amsterdam. eBook ISBN: 9780080924793
- [24] Hijmans RJ., Cameron SE., Parra JL., Jones PG., Jarvis A., Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas, *Int. J. Climatol.*, 25(2005) : 1965-1978. <https://doi.org/10.1002/joc.1276>
- [25] Phillips S., Dudík M. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation, *Ecography*, 31(2008): 161-175. <https://doi.org/10.1111/j.0906-7590.2008.5203.x>
- [26] Cheddadi R., Henrot A-J., François L., Boyer F., Bush M., Carré M., Coissac E., De Oliveira PE., Ficetola F., Hambuckers A., Huang K, Lézine A-M., Nourelbait M., Rhoujjati A., Taberlet P., Sarmiento F., Abel-Schaad D., Alba-Sánchez F., Zheng Z., Microrefugia, Climate Change, and Conservation of *Cedrus atlantica* in the Rif Mountains, Morocco. *Front. Ecol. Evol.*, 5 (2017): 114. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00114>
- [27] Aussenac, G., Finkelstein D (1983) – Influence de la sécheresse sur la croissance et la photosynthèse du cèdre. *Ann. Des Sci. Forest.* 40, 67–77. <https://doi.org/10.1051/forest:19830103>
-

---

# Revue Nature et Technologie

---

Academic Journal with an International Dissemination

---

