

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Domaine : S.N.V



Thèse

Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Filière : Sciences Agronomiques
Spécialité: Microbiologie

Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté

Présentée par : Mme TAHLAITI HAFIDA

Soutenue publiquement le : 18/03/2019

Devant le jury composé de :

NEMMICHE Saïd	Professeur	Université de Mostaganem	Président
BELAHCENE Miloud	Professeur	C .U. Ain Temmouchent	Examineur
BELHADI ABDELKADER	Professeur	Université de Saïda	Examineur
BEKADA Ahmed	Professeur	C .U. Tissemsilet	Examineur
AÏT SAADA Djamel	MCA	Université de Mostaganem	Examineur
DALACHE Fatiha	Professeur	Université de Mostaganem	Directrice de thèse

Année universitaire 2018- 2019

A Sophia

Puisses-tu vivre dans un monde meilleur

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu ma responsable de thèse, le professeur Fatiha Dalache de m'avoir proposé de travailler sur ce sujet de thèse et de m'avoir fait confiance pour débiter cette nouvelle thématique, vos précieux conseils m'ont permis d'avancer.

Mes remerciements s'adressent au président du jury le professeur Nemmiche d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Je remercie également Mr Belahcène, Professeur au centre Universitaire de Ain Temouchent, Mr Belhadi, Professeur à l'université de Saïda, Mr Bekada Professeur à l'université de Tissemsilt et Mr Aït Saada Maître de Conférences A à l'université de Mostaganem d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie vivement Mme Rechidi-sidhoum pour les grandes discussions qu'on a eues ensemble et qu'ils m'ont données du baume au cœur.

Je remercie Melle Meghoufel pour les agréables moments passés au laboratoire.

Je remercie mon amie Mme Ouahrani Nouria pour son soutien moral.

Mes remerciements s'adressent également aux doctorants du laboratoire des sciences et techniques de la production animale.

Je remercie Mr Benharrat Noredine pour son aide et sa disponibilité.

Je remercie également Mme Lazreg Hafida et Mr Benbouziane Djilali du laboratoire pédagogique du département de biologie pour leur disponibilité.

Je remercie Mme Habchi-Zegrar Khelil Méryem pour tous les tracas qu'elle a endurés pendant la préparation de cette thèse.

Résumé

Les grains de blé appelé « hamoum » est un blé qui a passé un long séjour dans un silo souterrain. Notre étude s'est intéressée aux bactéries lactiques isolées à partir de ce substrat. Trente neuf isolats ont été retenus et pré- identifiés par les méthodes phénotypiques classique en utilisant les différents tests usuels (croissance à différentes concentrations, thermorésistance etc.).Les résultats montrent qu'ils appartiennent essentiellement aux *Lactobacillus* (69 %), *Pediococcus* (15%),*Leuconostoc* (8%) et *Enterococcus* (8%).Des activités antagonistes inter-bactéries ont permis de mettre en évidence quatorze isolats performants. Les bactéries lactiques ayant un potentiel probiotique doivent répondre à un certain nombre de propriétés probiotiques (activité antagoniste, tolérance à l'acidité et aux sels biliaires).L'activité antagoniste vis-à-vis de 3 germes pathogènes (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ont montré des zones d'inhibitions avec des halos clairs et bien distincts. Les isolats lactiques ont inhibés les bactéries pathogènes à 77,44%.Les lactobacilles ont montré un fort pouvoir inhibiteur. L'emploi d'un milieu tamponné a permis des levées d'inhibitions dans 10,25% des cas et une diminution des diamètres d'inhibitions dans 62,4% des cas. Après un screening basé sur la méthode de Fleming et *al.*, (1975), une quinzaine d'isolats ont subi une caractérisation protéomique au MALDI-TOF MS dont quatre ont été identifiés avec un score d'identification satisfaisant : *Lactobacillus plantarum* BHL23, *Lactobacillus plantarum* BHL27, *Lactobacillus brevis* BHL8 et *Pediococcus acidilactici* BHC6.Les quatre souches identifiées présentent une activité antibactérienne élevée et persiste après traitement avec la catalase mais disparaît en présence des deux enzymes protéolytiques testées, ce qui indique que les agents actifs sont de nature protéique. L'effet probiotique a été évalué par la survie à différents pH (2.5, 4.5 et 6.5) et à différentes concentrations de sels biliaires à (0.3%,0.5% et 1%).Les résultats indiquent que toutes les souches présentent une résistance aux pH acides et aux sels biliaires en particulier *Lactobacillus plantarum* qui dépasse les 100% après 3h d'incubation. L'étude de la résistance aux antibiotiques a montré que seule la souche BHL8 est sensible aux antibiotiques testés. Le hamoum est un substrat riche en bactéries lactiques qui présente de bons potentiels probiotique.

Mots clés : blé fermenté, hamoum, bactéries lactiques, caractérisation phénotypique, MALDI-TOF SM, effet probiotique, sels biliaires, acidité.

Abstract

Wheat grains called "hamoum" is a wheat that has spent a long time in an underground silo. Our study was interested in lactic acid bacteria isolated from this substrate. Thirty-nine isolates were selected and pre-identified by conventional phenotypic methods using the different usual tests (growth at different concentrations, heat resistance, etc.). The results show that they belong mainly to *Lactobacillus* (69%), *Pediococcus* (15%), *Leuconostoc* (8%) and *Enterococcus* (8%) Inter-bacterial antagonist activities revealed fourteen successful isolates. Lactic acid bacteria with a probiotic potential must respond to a number of probiotic properties (antagonistic activity, tolerance to acidity and bile salts) Antagonistic activity against 3 pathogenic microorganisms (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) showed zones of inhibition with clear and distinct halos. Lactic isolates inhibited pathogenic bacteria at 77.44%. Lactobacilli showed strong inhibitory activity. The use of a buffered medium enabled inhibitory surges in 10.25% of cases and a decrease in inhibition diameters in 62.4% of cases. After a screening based on the method of Fleming et al. (1975), about fifteen isolates were proteomic characterized to MALDI-TOF MS, four of which were identified with a satisfactory identification score: *Lactobacillus plantarum* BHL23, *Lactobacillus plantarum* BHL27, *Lactobacillus brevis* BHL8 and *Pediococcus acidilactici* BHC6. The four identified strains show high antibacterial activity and persist after treatment with catalase but disappear in the presence of the two proteolytic enzymes tested, indicating that the active agents are of protein nature. The probiotic effect was evaluated by survival at different pHs (2.5, 4.5 and 6.5) and at different bile salt concentrations at (0.3%, 0.5% and 1%). The results indicate that all strains show resistance to pH acid and bile salts especially *Lactobacillus plantarum* that exceeds 100% after 3 hours of incubation. The study of antibiotic resistance showed that only strain BHL8 is sensitive to the antibiotics tested. Hamoum is a substrate rich in lactic acid bacteria that has good probiotic potential.

Key words: fermented wheat, hamoum, lactic acid bacteria, phenotypic characterization, MADI-TOF SM, probiotic effect, bile salts, acidity.

ملخص

حبوب القمح هو القمح الذي قضى وقتا طويلا في صومعة الدراسة. لدينا تحت "Hamoum" ودعا الأرض ركزت على بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من الركيزة. وقد تم اختيار تسعة وثلاثون عزلة ومحددة مسبقا من قبل وسائل المظهرية التقليدية باستخدام مختلف الاختبارات المعتادة (النمو بتركيزات مختلفة، ومقاومة الحرارة وغيرها...). وأظهرت النتائج أنهم ينتمون أساسا إلى الملبنة (69%)، المملسة (15%)، النسقة (8%) والمكورات المعوية (8%). وقد ساعدت بين البكتيريا أنشطة معادية لتسليط الضوء على أربعة عشر الأداء يعزل. بكتيريا حمض اللاكتيك وجود إمكانات بروبيوتيك يجب تلبية عدد من الخصائص بروبيوتيك (النشاط خصم والتسامح لأملاح حمض الصفراء و النشاط العذائي) وجها لوجه 3 *E. coli* ATCC الإشريكية ، ATCC 25923 مسببات الأمراض (المكورات العنقودية الذهبية أظهرت مناطق تثبيط مع هالات واضحة (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و 25922) ومتميزة. العزلات اللاكتيكية تثبط البكتيريا المسببة للأمراض عند 77.44%. وأظهرت اکتوباکيللي نشاط مثبت قوي. وقد سمح استخدام وسيلة مخزنة الموانع رفعت في 11.21% من الحالات وانخفض الموانع بأقطار 65، 42% من الحالات. وبعد فحص يعتمد على طريقة فليمينغ وآخرون، (1975)، خمسة عشر التي تم تحديدها أربعة مع درجة تحديد مرضية MALDI-TOF MS يعزل خضع توصيف البروتين ، الملبنة خنصر اليد ومملسة الحمض *BHL27 plantarum* ، الملبنة حددت *BHL23 plantarum* أربع سلالات معرض النشاط المضاد للبكتيريا عالية واستمرت بعد العلاج BHL8, BHC6.Les اللبني مع الكاتالاز لكن يختفي في وجود اثنين من الانزيمات المحللة للبروتين اختبار، مشيرا إلى أن عناصر نشطة والبروتين في الطبيعة. تم تقييم تأثير الكائنات الحية المجهرية التي كتبها بقاء في درجة الحموضة المختلفة (2.5، 4.5 و 6.5) وتركيزات مختلفة من الأملاح الصفراوية (0.3%، 0.5% و 1%). وتشير النتائج إلى أن جميع سلالات مقاومة لل أملاح حمض الأس الهيدروجيني والأملاح الصفراوية وخاصة العصية النباتية التي تتجاوز 100% بعد 3 ساعات من الحضارة. وأظهرت دراسة مقاومة المضادات فقط حساسة للمضادات الحيوية التي تم اختبارها. حموم هو ركيزة غنية BHL8 الحيوية أن السلالة بكتيريا حمض اللاكتيك التي لديها إمكانات بروبيوتيك جيدة

كلمات البحث:

القمح المخمرة " حموم " ، بكتيريا اللاكتيك، توصيف المظهري، أثر الكائنات الحية المجهرية-MALDI TOF MS ، الخصائص بروبيوتيك، أملاح الصفراء، الحموضة.

LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC : American Type Culture Collection

ATB : antibiotiques

A_w : activité d'eau

BM : bleu de méthylène

BSH : hydrolase de sel biliaire

CRAPC : Centre de Recherche scientifique et technique en Analyses Physico-Chimiques

CHCA : Acide α -Cyano-4-Hydroxy-Cinnamique

DHB : Acide 2,5 Dihydroxy-Benzoïque

$^{\circ}D$: degré Dornic

EPS : Exopolysaccharides

FAO : Food and Agriculture Organization- Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

KDa: KiloDalton

MALDI-TOF MS:Matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry

M 17 : gélose de Terzaghi

MRS : De Man, Rogosa et Sharpe

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Rpm : rotation par minute

UFC : Unité Formant Colonie

V.P : Vogues Proskauer

WHO : World Health Organization (OMS)- Organisation Mondiale de la Santé

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: ALIMENTS ET BOISSONS TRADITIONNELS, A BASE DE CEREALES FERMENTEES, CONSOMMEES DANS DIFFERENTES REGIONS DU MONDE (GUYOT,2010).	10
TABLEAU 2 : CLASSIFICATION DES BACTERIOCINES PRODUITES PAR LES BACTERIES A GRAM POSITIF	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
TABLEAU 3: PRINCIPAUX CRITERES UTILISES POUR LA SELECTION DES SOUCHES PROBIOTIQUES	40
TABLEAU 4: CRITERES DE SELECTIONS UTILISES AUX LABORATOIRES POUR LE SCREENING DES PROBIOTIQUES	41
TABLEAU 5: MILIEUX SELECTIFS DES SOUCHES PATHOGENES	54
TABLEAU 6: SOUCHES PATHOGENES	54
TABLEAU 7: SCORE DE CONCORDANCE DES SPECTRES OBTENUS	60
TABLEAU 8: LES DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES UTILISES	67
TABLEAU 9: RESULTATS DE LA PRE-IDENTIFICATION DES ISOLATS	71
TABLEAU 10: CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE DES BACTERIES LACTIQUES	73
TABLEAU 11: CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES BACTERIES LACTIQUES.	75
TABLEAU 12: PROFILS FERMENTAIRE DES ISOLATS LACTIQUES	78
TABLEAU 13: LES DIFFERENTS GROUPES DU GENRE <i>LACTOBACILLUS</i>	80
TABLEAU 14: TABLEAU RECAPITULATIF DES RESULTATS DES TESTS DE PRE-IDENTIFICATION DES BACTERIES LACTIQUES.	82
TABLEAU 15: IDENTIFICATION DES ISOLATS BACTERIENS PAR MALDI-TOF MS.	85
TABLEAU 16: SCORE DE CONCORDANCE DES SPECTRES OBTENUS A PARTIR D'UNE BACTERIE D'INTERET AVEC CEUX DE LA BASE DE DONNEES BIOTYPER	86
TABLEAU 25: ANTIBIOGRAMME DES SOUCHES LACTIQUES	123
TABLEAU 17 : RESULTAT DE L'ACIDITE PRODUITE PAR LES SOUCHES LACTIQUES	173
TABLEAU 18 : INTERACTIONS ENTRE GENRE DES BACTERIES LACTIQUES EN MILIEU SOLIDE	173
TABLEAU 18A	174
TABLEAU 18B.	174
TABLEAU 18C	175
TABLEAU 18D	175
TABLEAU 18E	175
TABLEAU 18F	176
TABLEAU 19: ACTIVITE ANTAGONISTE INTER-BACTERIENNE EN MILIEU TAMPONNE (T) ET NON TAMPONNE (NT).	176
TABLEAU 20 : RESULTAT DES INTERACTIONS DES BACTERIES LACTIQUES VIS-A-VIS DES BACTERIES PATHOGENES	177
TABLEAU 21 : ACTIVITE ANTAGONISTE DES SOUCHES LACTIQUES EN MILIEU TAMPONNE (T) ET NON TAMPONNE (NT).	178

TABLEAU 22 : EFFET INHIBITEUR DES SOUCHES LACTIQUES EN PRESENCE D'ENZYMES	178
TABLEAU23 : RESULTAT DU STRESS ACIDE SUR LES SOUCHES LACTIQUES	178
TABLEAU 24 : RESULTATDE LA TOLERANCE DES SELS BILIAIRES SUR LES SOUCHES LACTIQUES.	179

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: FORME D'UNE MATMORA	5
FIGURE 2 : ASPECT DE BLE FERMENTE A, ET OUVERTURE D'UNE MATMORA B	6
FIGURE 3: ARBRE PHYLOGENETIQUE CONSENSUS, BASE SUR LA COMPARAISON DE SEQUENCE D'ARNR 16S, MONTRANT LES PRINCIPAUX GROUPES DE BACTERIES LACTIQUES, AYANT UN FAIBLE CONTENU MOL% DE G+C DE L'ADN AINSI QUE LES BACTERIES GRAM POSITIVES NON RELIEES DES GENRES <i>BIFIDOBACTERIUM</i> ET <i>PROPIONIBACTERIUM</i>	15
FIGURE 4: <i>LACTOBACILLUS CASEI</i> AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE.	17
FIGURE 5 : <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> , AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE	17
FIGURE 6 : <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i> , AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE	18
FIGURE 7 : <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE	19
FIGURE 8: <i>LEUCONOSTOC MESENTEROÏDES</i> AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE.	20
FIGURE 9: <i>PEDIOCOCCUS</i> AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE.	21
FIGURE 10: <i>BIFIDOBACTERIUM SP</i>	22
FIGURE 11: DIFFERENTS TYPES DE FERMENTATION	23
FIGURE 12 : SCHEMA DE LA FERMENTATION DES ACIDES MIXTES	24
FIGURE 13 : FORMATION DE PORES MEMBRANAIRES PAR LE COMPLEXE NISINE-LIPIDE II	31
FIGURE 14 : MODE D'ACTION DES DIFFERENTES CLASSES DE BACTERIOCINES	33
FIGURE 15: LES PRINCIPAUX EFFETS BENEFIQUES ATTRIBUES AUX PROBIOTIQUES.	44
FIGURE 16 : SPECTROMETRE DE MASSE BRUCKER DALTONICS GERMANY ET SON UNITE INFORMATIQUE	50
FIGURES 17& 18: ASPECT MACROSCOPIQUE DE BHL1 (A GAUCHE) ; ASPECT MACROSCOPIQUE DE L'ISOLAT BHL10	69
FIGURE 19&20: ASPECT MICROSCOPIQUE DES CELLULES APRES COLORATION DE GRAM (X1000), COCCI (A GAUCHE), BACILLE (A DROITE)	70
FIGURE 21: PROPORTION DES BACTERIES LACTIQUES	71
FIGURE 22: TESTS DE CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES BACTERIES LACTIQUES. T : TEMOIN.	77
FIGURE 23 : REPARTITION DES GENRES A PARTIR DES DIFFERENTS ISOLATS DE BLE FERMENTE.	77
FIGURE 24 : DISTRIBUTION QUANTITATIVE DES ESPECES PRESUMEEES DE BACTERIES LACTIQUES.	82
FIGURE 25: SPECTRE DE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> BHL23	88
FIGURE 26 : SPECTRE DE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> BHL27	88
FIGURE 27 : SPECTRE DE <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i> BHL8	89
FIGURE 28 : SPECTRE <i>PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI</i> BHC6	89
FIGURE 29: SPECTRE A PIC <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> BHL23	90
FIGURE 30: SPECTRE A PIC DE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> BHL 27	90

FIGURE 31 : SPECTRE A <i>PIC LACTOBACILLUS BREVIS</i> BHL8	91
FIGURE 32 : SPECTRE A <i>PIC</i> DE <i>PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI</i> BHC	6
91	
FIGURE 33 : EVALUATION DE LA QUANTITE D'ACIDE LACTIQUE PRODUITE AU COURS DU TEMPS CHEZ LES SOUCHES TESTEES.	93
FIGURE 34: EVOLUTION DE LA CONCENTRATION D'ACIDE LACTIQUE ET DU PH DE LA SOUCHE <i>PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI</i> (BHC6).	95
FIGURE 35: EVOLUTION DE LA CONCENTRATION D'ACIDE LACTIQUE ET DU PH DE LA SOUCHE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> (BHL27).	95
FIGURE 36: EVOLUTION LA CONCENTRATION D'ACIDE LACTIQUE ET DU PH DE LA SOUCHE <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> (BHL23).	96
FIGURE 37: EVOLUTION LA CONCENTRATION D'ACIDE LACTIQUE ET DU PH DE LA SOUCHE <i>LACTOBACILLUS BREVIS</i> (BHL8).	96
FIGURE 38 : INHIBITIONS DES ISOLATS LACTIQUES PAR BHL6	97
FIGURE 39 : INHIBITIONS DES BACTERIES LACTIQUES EN MILIEU SOLIDE	98
FIGURE 40 : INTER-INHIBITION ET AUTO-INHIBITION DES BACTERIES LACTIQUES EN MILIEU SOLIDE.	98
FIGURE 41 : TAUX DES INHIBITIONS INTER-GENERIQUES DES BACTERIES LACTIQUES.	99
FIGURE 42 : TAUX DES INHIBITIONS DES ISOLATS LACTIQUES EN MILIEU TAMPONNE (T) ET NON TAMPONNE (NT).	101
FIGURE 43 : TAUX D'INHIBITION DE BHC5 PAR LES ISOLATS LACTIQUES EN MILIEU TAMPONNE (T) ET NON TAMPONNE (NT).	101
FIGURE 44 : TAUX D'INHIBITION DE BHC4 PAR LES ISOLATS LACTIQUES EN MILIEU TAMPONNE (T) ET NON TAMPONNE (NT).	102
FIGURE 45: TAUX D'INHIBITION DE BHL12 PAR LES ISOLATS LACTIQUES EN MILIEU TAMPONNE (T) ET NON TAMPONNE (NT).	102
FIGURE 46: TAUX D'INHIBITION DE BHL6 PAR LES ISOLATS LACTIQUES EN MILIEU TAMPONNE (T) ET NON TAMPONNE (NT).	103
FIGURE 47: TAUX D'INHIBITION DE BHL7 PAR LES ISOLATS LACTIQUES EN MILIEU TAMPONNE (T) ET NON TAMPONNE (NT).	103
FIGURE 48:TAUX D'INHIBITION DE L'ISOLAT BHL9 PAR LES BACTERIES LACTIQUES EN MILIEU TAMPONNE (T) ET NON TAMPONNE (NT).	104
FIGURE 49: TAUX D'INHIBITION DE BHL21 PAR LES ISOLATS LACTIQUES EN MILIEU TAMPONNE (T) ET NON TAMPONNE (NT).	104
FIGURE 50:ACTIVITE INHIBITRICE DE 4 SOUCHES LACTIQUES VIS-A-VIS DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .	106
FIGURE 51: TAUX D'INHIBITIONS DES BACTERIES PATHOGENES PAR LES BACTERIES LACTIQUES.	107

FIGURE 52 TAUX DES INHIBITIONS DES BACTERIES PATHOGENES PAR LES BACTERIES LACTIQUES EN MILIEU TAMPONNE (T) ET NON TAMPONNE(NT).	108
FIGURE 53: INHIBITION DE LA SOUCHE <i>E. COLI</i> PAR LES BACTERIES LACTIQUES EN MILIEU TAMPONNE (T) ET NON TAMPONNE (NT).	109
FIGURE 54 : INHIBITION DE LA SOUCHE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> PAR LES BACTERIES LACTIQUES EN MILIEU TAMPONNE(T) ET NON TAMPONNE (NT).	109
FIGURE 55 : INHIBITION DE LA SOUCHE <i>STAPHYLOCOCCUSAUREUS</i> PAR LES BACTERIES LACTIQUES EN MILIEU TAMPONNE (T) ET NON TAMPONNE (NT)	109
FIGURE 56: ZONES D'INHIBITION DES SOUCHES BHC6 ET BHL27 VIS-A-VIS DE LA SOUCHE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	110
FIGURE 57: ZONES D'INHIBITION DES SOUCHES BHL23 ET BHL27 VIS-A-VIS D'E.COLI.	110
FIGURE 58: EFFET INHIBITEUR DES SOUCHES LACTIQUES VIS-A-VIS DE LA SOUCHE <i>STAPHYLOCOCCUSAUREUS</i> EN MILIEU TAMPONNE.	111
FIGURE 59 : ACTIVITES INHIBITRICES DES 4 SOUCHES LACTIQUES VIS-A-VIS DES SOUCHES PATHOGENES TESTEES EN MILIEU TAMPONNE (T) ET NON TAMPONNE (NT).	112
FIGURE 60: EFFETS DES DIFFERENTES ENZYMES	113
FIGURE 61 : TOLERANCE A L'ACIDITE DE SOUCHES LACTIQUES	118
FIGURE 62: TOLERANCE DES SELS BILIAIRES DES SOUCHES LACTIQUES.	119
FIGURES 63& 64 : ANTIBIOGRAMME DE LA SOUCHE BHL8.	125
FIGURE 65 : ANTIBIOGRAMME DE LA SOUCHE BHC6.	125
FIGURE 66 : ANTIBIOGRAMME DE LA SOUCHE BHL23.	125
FIGURE 67 : ANTIBIOGRAMME DE LA SOUCHE BHL27	125

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	3
ABSTRACT	4
ملخص	5
LISTE DES ABREVIATIONS	5
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES FIGURES	10
INTRODUCTION	1
I – SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1.1. Blé dur et autres céréales	4
1.1.1. Le grain de blé	4
1.1.2. Taxonomie	4
1.1.4. Facteurs favorisant l'altération des grains	6
1.1.4.1. Influence de l'humidité	6
1.1.4.2. Influence de la température	6
1.1.5. Modifications du blé fermenté	7
1.1.5.1. Modifications visuelles et olfactives	7
1.1.5.2. Modifications biochimiques	8
1.1.2. Autres céréales	9
1.1.3. Aliments et boissons fermentés	9
1.1.4. Blé fermenté	11
1.2. Les bactéries lactiques	12
1.2.1. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques	12
1.2.2. Classification des bactéries lactiques	13
1.2.3. Caractéristiques des principaux genres de bactéries lactiques	16
1.2.3.1. Genre <i>Lactobacillus</i>	16
1.2.3.2. Genre <i>Lactococcus</i>	17
1.2.3.3. Genre <i>Streptococcus</i>	18
1.2.3.4. Genre <i>Enterococcus</i>	19

1.2.3.5. Genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	20
1.2.3.6. Genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	20
1.2.3.7. Genre <i>Bifidobacterium</i>	21
1.2.4. Métabolisme des bactéries lactiques	22
1.2.4.1. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques	22
1.2.4.2. Voie homofermentaire ou EM	23
1.2.4.3. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate	24
1.2.4.4. Voie bifide ou FPC (Fructose 6- phospho- cétolase)	25
1.2.5. Intérêts des bactéries lactiques	25
1.2.5.1. Dans la biopréservation	25
1.2.5.2. Dans l'industrie alimentaire	26
1.3. Les activités antimicrobiennes des bactéries lactiques	27
1.3.1. Les acides organiques	27
1.3.2. Le peroxyde d'hydrogène	27
1.3.3. Le dioxyde de carbone	28
1.3.4. Le diacétyl	28
1.3.5. La reutérine	28
1.3.6. Les bactériocines	28
1.3.6.1. Nomenclature et classification des bactériocines	29
❖ Classe I: Les lantibiotiques	30
❖ Classe II	32
❖ Classe III	33
❖ Classe IV	34
1.3.6.2. Propriétés des bactériocines	34
1.3.6.3. Production des bactériocines	35
1.3.6.4. Conditionnement des bactériocines	35
1.3.6.5. Bactériocines en agroalimentaire	35
1.3.6.6. Utilisation alimentaire des bactériocines	36
1.3.6.7. Applications médicales des bactériocines	37
1.4. Les probiotiques	38
1.4.1. Historique et développement du concept probiotique :	38

1.4.2. Définition	39
1.4.3. Principales espèces de bactéries lactiques à potentiel probiotique	39
1.4.4. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques	40
1.4.4.1. Résistance à l'acidité	41
1.4.4.2. Résistance aux sels biliaires	41
1.4.4.3. Adhésion aux cellules intestinales	41
1.4.4.4. Production de substances antimicrobiennes	42
1.4.4.5. Résistance aux antibiotiques	42
1.4.5. Mécanisme d'action	42
1.4.6. Critères technologiques	43
1.4.7. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé	43
1.4.8. Applications des probiotiques	44
1.5. Les interactions	46
1.5.1. Définition	46
1.5.2. Différents types d'interactions	47
1.5.2.1. Interactions positives : Synergie	47
1.5.2.2. Les interactions négatives : Inhibition	47
1.6. Identification des bactéries par MALDI-TOF MS	49
1.6.1. Le spectromètre de masse MALDI-TOF MS	49
1.6.2. La spectrométrie de masse	49
2. MATERIEL ET METHODES	52
2.1. Origine et échantillonnage du blé fermenté :	52
2.2 .Milieux de culture et conditions de croissance	52
2.3. Isolement des bactéries lactiques	52
2.4. Purification et pré-identification des isolats et leur appartenance au groupe lactique	53
➤ Examen macroscopique et microscopique :	53
➤ Recherche de la catalase :	53

2.5. Conservations des bactéries lactiques	53
2.6. Souches pathogènes utilisées	54
2.6.1. Vérification de la pureté et de l'identité des souches pathogènes	54
2.7. Dénombrement des bactéries lactiques	55
2.8. Pré-identification phénotypique des bactéries lactiques	55
2.8.1. Caractérisation biochimique des isolats lactiques	55
2.8.1.1. Recherche de l'oxydase	55
2.8.1.2. Hydrolyse de l'esculine	56
2.8.1.3. Production des exopolysaccharides	56
2.8.1.4. Production d'acétoïne	56
2.8.1.5. Croissance sur lait bleu de Sherman	56
2.8.1.6. Recherche de l'Arginine dihydrolase (ADH).	57
2.8.1.7. Type fermentaire	57
2.8.1.8. Profil fermentaire des sucres.	57
2.8.2. Caractérisation physiologique des isolats lactiques	58
2.8.2.1. Croissance à pH 9.6	58
2.8.2.2. Croissance à différentes concentrations de NaCl	58
2.8.2.3. Croissance à différentes températures	58
2.8.2.4. Test de la thermorésistance	58
2.9. Eude du pouvoir acidifiant	58
2.10. Identification protéomique des isolats par MALDI-TOF SM	59
2.10.1. Préparation des isolats pour l'analyse protéomique	59
2.10.2. Analyse des spectres obtenus	59
2.11. Mise en évidence des interactions négatives	60
2.1.1. Inhibitions en milieu solide	60
2.1.2. Inhibitions entre bactéries lactiques	61
2.11.2.1. Méthode de Fleming et al.(1975)	61
2.11.2.2. Méthode de Barefoot et Klaenhammer(1983) ou méthode des puits	61

2.1.3.	Activité antimicrobienne des isolats lactiques contre des souches pathogènes	62
2.11.3.1.	Méthode de Fleming et <i>al.</i> 1975	62
2.11.3.2.	Méthode de Barefoot et Klaenhammer,1983	62
2.1.4.	Caractérisation de la nature des agents inhibiteurs	62
➤	Entre bactéries lactiques	62
➤	Avec les bactéries pathogènes	63
2.1.4.1.	Recherche des inhibitions dues au peroxyde d'hydrogène	63
2.11.4.2.	Recherche des inhibitions dues aux phages lysogènes	63
2.1.4.2.	Recherche des inhibitions dues aux bactériocines	64
➤	Effet de la trypsine	64
➤	Alpha-chymotrypsine	64
2.1.5.	Caractérisation des bactériocines	65
2.2.	Mise en évidence in vitro de quelques propriétés probiotiques	65
2.2.1.	Résistance aux conditions gastro-intestinales	65
2.2.1.1.	Test de survie au stress acide	65
2.2.1.2.	Test de survie au stress biliaire :	66
2.2.2.	Test de sensibilité aux antibiotiques	66
3.	RESULTATS ET DISCUSSION	68
3.1.	Dénombrement des bactéries	68
3.2.	Identification des bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté « Hamoum ».	68
3.2.1.	Pré-identification des isolats	69
3.2.2.	Etude des caractères biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques.	71
3.3.	Caractérisation des bactéries lactiques isolées à partir du blé fermenté par MALDI-TOF MS	85
3.4.	Etude du pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées à partir de blé fermenté.	92
3.5.	Mise en évidence des inhibitions inter-bactériennes	97
3.5.1.	Par la méthode de Fleming et <i>al.</i> ,(1975)	97
3.5.2.	Inhibition par production d'acides organiques	100
3.5.3.	Par la méthode des puits	105

3.6. Mise en évidence des inhibitions des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques.	105
3.6.1. Mise en évidence des inhibitions par la méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983).	106
3.6.2. Mise en évidence des inhibitions par la méthode de Fleming et al. (1975).	106
3.6.3. Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur	111
3.6.3.1. Inhibitions en milieu tamponné	111
3.6.3.2. Inhibitions due au peroxyde d'hydrogène	112
3.6.3.3. Inhibition due aux phages lysogènes	112
3.6.3.4. Inhibition due aux bactériocines	113
3.7. Etude du potentiel probiotique des souches lactiques	117
3.7.1. Tolérance à l'acidité	117
3.7.2. Tolérance aux sels biliaires	118
3.7.3. Détermination des profils de résistance des antibiotiques des souches de bactéries lactiques.	123
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	127
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES:	130
ANNEXES	180
Annexe 1	173
Annexe 2	173
PUBLICATION	180

INTRODUCTION

Introduction

Les céréales constituent la ressource alimentaire la plus importante au monde à la fois pour l'alimentation humaine et animale. Elles occupent une place stratégique dans l'alimentation de la population mondiale et en particulier dans les pays en développement. En effet, le blé (*Triticum* sp) est la céréale la plus cultivée par le monde et ses produits sont très importants dans la nutrition humaine, car ils fournissent un tiers des besoins en protéines et en énergie nécessaire pour un adulte (environ 2400kcal) (Alfonso et *al.*, 2013).

En Algérie, les céréales et leurs dérivés constituent la base alimentaire de la population (pain, couscous et pâtes) et son stockage revêt une grande importance.

Les systèmes de stockage utilisés nécessitent un contrôle de plusieurs paramètres en particulier la température et l'humidité (Niquet., 2006).

Le stockage souterrain est une méthode ancestrale utilisée pour constituer des réserves domestiques, sociales et commerciales. Cette technique de stockage appelée « Matmora » (Bartali et *al.*, 1989), présente plusieurs avantages : le maintien du blé à une température constante d'environ 20°C ; le produit est placé dans une atmosphère confinée sans oxygène d'où l'absence d'activité biologique ; protection des conditions environnementales ; limitation des risques de parasitisme du fait de la profondeur du silo et à moindre coût et enfin sa fabrication avec des matériaux locaux et un savoir-faire local (Bartali et *al.*, 1989) de même que sa disponibilité immédiate par l'utilisateur.

En Algérie, ce mode de stockage est bien connu de la population rurale. Il est utilisé à petites échelles au sein de certaines petites exploitations familiales en milieu rural et péri-rural de certaines régions de l'Algérie (Tiaret, Relizane, Mascara et Ghardaïa).

Les grains de blé ne sont pas des substrats favorables à la prolifération des microorganismes, mais l'augmentation de l'humidité et l'évolution de la température pendant leur conservation traditionnelle en silos souterrains, permet la prolifération de nombreux microorganismes qui entraînent la fermentation du blé en un produit du terroir Algérien nommé "Hamoum".

Il est essentiellement consommé dans les zones rurales sous forme de couscous et transformé en farine pour la fabrication du pain.

Les grains de hamoum sont de couleur gris-jaunâtre et présentent une forte odeur de fermentation due au long séjour dans la matmora.

En effet, la fermentation est un procédé ancestral et l'une des méthodes économiques les plus utilisés dans la consommation et la transformation des matières premières alimentaires. Elle prolonge leurs durées de vie en éliminant les facteurs toxiques et antinutritionnels. Leurs propriétés organoleptiques et multi- nutritionnelles sont également améliorées (Tamang, 2010d).

La Matmora est un milieu privilégié pour une grande diversité de microorganismes souvent responsables du déclenchement du processus de la fermentation et des modifications des caractéristiques du blé (Jeantet, 2007). La farine de blé est un produit agricole brut, soumis à des menaces microbiologiques, source de contamination primaire (Doyle et Buchanan, 2012). En effet, les grains de blé sont naturellement contaminés par des bactéries telles que *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Macroccoccus*, *Sarcine*, et *Serratia* qui peuvent être présentes dans les farines (Alfonso et al., 2013). De même, les bactéries lactiques peuvent être détectées dans les grains (Corsetti et al., 2007) et les farines de blé (Corsetti et al., 2001 ; Russo et al., 2010). En outre, il a été rapporté que les bactéries lactiques issues de la farine de blé peuvent également provenir de l'équipement de broyage et /ou de production (Berghofer et al., 2003).

Parmi ces microorganismes associés au blé fermenté (Gourchala et al., 2014), les bactéries lactiques jouent un rôle dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Elles sont omniprésentes dans la nature, et sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire. Les bactéries lactiques ont un rôle important dans la préparation, la conservation et la transformation de nombreux aliments fermentés, ce qui leur confère le statut GRAS « Generally Recognized As Safe » (Florou-Paneri et al., 2013). Elles jouent également un rôle important dans la fabrication de fromage et de divers produits laitiers fermentés (Stiles et Holzappel, 1997 ; Ali, 2010). Elles contribuent à la texture, à la saveur et à la production de composés aromatiques (Bourgeois et Larpent, 1996 ; Gerrit et al., 2005 ; Cholet, 2006). Elles produisent des substances antimicrobiennes comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène (Dortu et Thonart, 2009) et des bactériocines qui exercent une activité antagoniste vis-à-vis des microorganismes pathogènes et/ ou d'altérations (Gálvez et al., 2011). Les bactériocines ont suscité beaucoup d'intérêt dans la durée de la conservation des aliments ainsi que dans le contrôle des maladies infectieuses (FAO/OMS, 2002).

Actuellement, les bactéries lactiques présentent un grand intérêt pour leurs valeurs nutritionnelles et thérapeutiques dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques. La

connaissance de ces bactéries lactiques pourrait nous permettre de les utiliser dans la bioconservation, l'amélioration de la valeur nutritive des aliments et les préparations probiotiques. En effet, les bactéries lactiques sont considérées parmi la flore intestinale normale et jouent un rôle crucial dans le maintien et l'amélioration de la santé. Elles sont considérées comme des microorganismes à potentiel probiotique. Selon la F.A.O./OMS, (2002) ; les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante exercent un effet positif sur la santé au-delà des effets nutritionnels. Pour remplir cette fonction, les bactéries lactiques doivent répondre à un certain nombre de critères dont la tolérance à l'acidité et aux sels biliaires (Fuller, 1989 ; Saito, 2004).

Comparativement aux aliments fermentés des pays développés, relativement très peu de recherches ont été menées sur les aliments fermentés des pays émergents et encore moins sur leurs effets bénéfiques en santé que pourraient conférer les bactéries lactiques constitutives de leur microbiote. Ceci nous conduit à formuler la question suivante « Les bactéries lactiques des aliments fermentés comme le hamoum sont-elles susceptibles d'avoir certaines propriétés fonctionnelles d'intérêt en santé tant probiotique que nutritionnelle ? ».

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris notre étude afin de connaître l'influence de la fermentation due au stockage par la technique traditionnelle (Matmora). Nous avons mis en place une collection de souches de bactéries lactiques isolées à partir du hamoum par les méthodes phénotypiques classiques. Les bactéries ayant montré des propriétés probiotiques intéressantes (stress acide et résistance aux sels biliaires) et un bon potentiel inhibiteur ont été retenus pour une identification par la technique MALDI-TOF.

Le manuscrit de la thèse comprend trois chapitres avec une introduction, une conclusion générale et quelques perspectives.

Le premier chapitre comprend une synthèse bibliographique sur le statut des céréales et du blé fermenté en particulier, sur les bactéries lactiques avec les caractéristiques et les intérêts qui s'y rapportent et les propriétés probiotiques de ces dernières.

Le second chapitre consacré au matériel et méthode présente l'origine du matériel biologique et décrit avec précision tous les protocoles expérimentaux.

Le troisième chapitre regroupe les résultats et leur discussion. Enfin, le manuscrit s'achève par la présentation de la conclusion et des perspectives et par les références bibliographiques et les annexes.

I – SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Blé dur et autres céréales

1.1.1. Le grain de blé

Le grain de blé constitue le fruit de la plante, c'est un fruit sec (caryopse) qui contient à l'intérieur la graine proprement dite. Il est de forme ovale, arrondi à ses deux extrémités qui sont inégales et de grosseur variable, son examen révèle : une face dorsale plus ou moins bombée et une face ventrale, comportant un sillon profond. À sa partie supérieure, se trouvent des courts poils qui forment la brosse. À sa partie inférieure, visible sur la face dorsale, se trouve une légère dépression correspondante à l'embryon ou le germe (Calvel, 1984). La longueur du grain est comprise entre 5 et 9 mm, et le poids est compris entre 35 et 50 mg (Šramková et al., 2009).

Les deux espèces qui dominent aujourd'hui la production du blé sont : le blé tendre et le blé dur. Plusieurs autres espèces existent, toutefois elles ne sont cultivées qu'en faibles quantités.

1.1.2. Taxonomie

Le blé est une monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* de la famille des *Gramineae* ou *Poaceae* (Branlard, 2010). Les deux espèces les plus cultivées sont le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*) mais il existe de nombreuses autres espèces de *Triticum* qui se différencient par leur degré de ploïdie et par leur nombre de chromosomes (14, 28 ou 42). Le blé dur contient deux génomes AA et BB et 28 chromosomes (Feillet, 2000).

1.1.3. Stockage du blé

Le stockage adéquat des denrées agricoles est une partie intégrante de leur processus de production. Il est déployé pour assurer la sécurité alimentaire. Ainsi, il est considéré comme un bouclier contre l'échec et la famine. Les modalités techniques de stockage ont évolué avec les époques et les lieux. Les enjeux sont restés les mêmes mais l'évolution technique a surtout permis une augmentation des capacités de stockage et une accélération des échanges. De nos jours, les silos modernes permettent de stocker plusieurs types de céréales en même temps (Doumandji, 2003).

Il existe différents types de silos.

- ✓ Les silos aériens, en béton armé pouvant contenir de grande quantité de blé du fait de sa hauteur atteignant parfois 100m (Reimbert, 1982). Ces silos se prêtent à l'utilisation comme silos portuaires du fait de leur bonne consistance à la corrosion.

- ✓ Les silos métalliques de forme géométrique.

- ✓ Les greniers domestiques à base de terre, à armature de bambou ou en paille (Kodio, 1989). Les grains sont conservés en épis ou en vrac, d'une capacité de 3 à 7 tonnes. Ils sont généralement surélevés pour éviter l'attaque des rongeurs.
- ✓ Silos souterrains appelé « Matmora » (Figure 2). Le stockage souterrain des céréales est une technique largement utilisée en milieu rural dans plusieurs régions céréalières du monde en général (Bartali et Debbarih, 1991). Cette technique de stockage des céréales est appelée « Matmora ». Elle consiste à enfouir le produit dans le sol dans une cavité d'une capacité moyenne de 5 tonnes environ. La "Matmora" présente une forme cylindrico-conique, cylindrique, sphérique ou amphorique (FAO, 1994 ; Bartali *et al.*, 1989) revêtue d'un enchevêtrement de paille de blé et d'orge où bien par des feuilles de plastique. Celles-ci jouent un rôle important dans la réduction des risques de détérioration du grain stocké par les eaux souterraines. En général, les matmoras sont situées soit dans la maison soit à l'extérieur, proches ou éloignées de l'habitation, parfois dans un milieu protégé ou fortifié (Kanafani, 1994 ; Bartali et Debbarih, 1991). L'inconvénient majeur de cette méthode de stockage est la trop forte humidité et les eaux d'infiltration qui favorisent le développement des microorganismes et la fermentation bactérienne (Doumandji *et al.*, 2003).

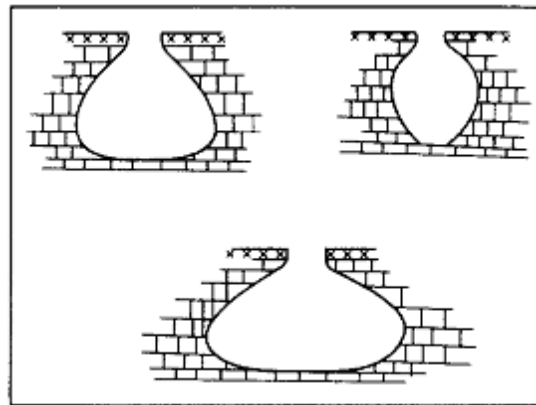


Figure 1: Forme d'une matmora (Bartali, 1987).



Figure2 : Aspect de blé fermenté A, et ouverture d'une matmora B (Bekhouche et *al.*, 2013)

1.1.4. Facteurs favorisant l'altération des grains

1.1.4.1. Influence de l'humidité

La faible teneur en humidité est le facteur le plus important pour la conservation des grains lors du stockage. Les grains, stockés avec le contenu d'humidité élevé, sont soumis à des pertes élevées causées par l'attaque des insectes et les champignons (Vásquez et *al.*, 2008). Elle favorise la respiration des grains et accentue en conséquence le dégagement de chaleur au sein des grains stockés. Il est généralement admis que le dégagement de chaleur double pour chaque accroissement de 1.5 % de l'humidité du grain et donc que la durée probable de conservation d'un stock est diminuée de moitié. Les altérations sont accentuées par le fait que les grains humides favorisent le développement des micro-organismes présents à la surface du grain (Cruz et *al.*, 2002). En effet à une humidité inférieure, les champignons ne poussent pas, mais à environ 14% ou légèrement au-dessus, la croissance fongique a lieu (Hoseney, 1994). Les moisissures du genre *Penicillium* ne se développent pas dans les lots de blé maintenus à 14% d'humidité et à un taux relatif interstitiel de 70% (Boudreau et Ménard, 1992). Des activités lipolytique et protéolytiques plus élevées sont liées à la plus forte teneur en humidité, ce qui conduit encore à une perte en nutriments (protéines et lipides) (Butt et *al.*, 2004).

1.1.4.2. Influence de la température

La température joue un rôle important dans la conservation des grains (Cruz et *al.*, 2002). Elle est le facteur le plus important qui affecte la qualité du grain au cours du stockage (Kusińska, 2001).

Elle intervient d'une part sur la valeur de l' A_w et d'autre part, sur les vitesses des réactions chimiques et enzymatiques et donc la croissance des microorganismes (Richard-Molard, 1998). Une

augmentation de température se traduit par un dégagement de chaleur au sein de la masse des grains qui double pratiquement pour chaque élévation de 5°C de la température, ceci jusqu'à environ 28°C (au-delà l'effet diminue); la durée probable de conservation d'un stock est ainsi diminuée de moitié (Cruz et *al.*, 2002). Au cours de la conservation, plus la température est élevée et plus les réactions biologiques des microorganismes sont rapides (Multon, 1982).

1.1.4.3. Influence de l'atmosphère confinée

La respiration des grains stockés dans une structure étanche appauvrit l'atmosphère interstitielle en oxygène et l'enrichit en gaz carbonique. Cette modification de la composition des gaz du milieu peut bloquer le développement des moisissures et détruire les insectes présents. Ce principe est appliqué dans les méthodes de stockage souterrain (fosses) pratiquées de manière traditionnelle. Cependant, si les grains sont emmagasinés avec une humidité excessive, des risques de fermentation apparaissent et donnent lieu à des pertes importantes qui peuvent atteindre l'ensemble du stock (Cruz et *al.*, 2002).

1.1.4.4. Influence de la composition du grain

La structure anatomique des grains de blé, leur composition biochimique (Richard-Molard, 1998) et l'état physique, influent sur la croissance et l'activité des microorganismes (Cahagnier, 1998). La zone du germe, biochimiquement plus riche que l'enveloppe ou l'amande amylacée, constitue le meilleur point de départ pour la croissance des moisissures. Des travaux ont pu montrer que même à de très faible activité d'eau (0.75-0.85), les lipides neutres des grains dont le germe est riche, ne présente pas une source de carbone accessible à la lipase fongique et constituent sans doute des éléments essentiels pour l'initiation de la croissance des moisissures xérotolérantes (Haard et *al.*, 1999).

1.1.5. Modifications du blé fermenté

1.1.5.1. Modifications visuelles et olfactives

➤ Décoloration

La décoloration peut être causée par les champignons de champ et de stockage entraînant ainsi un noircissement du germe de blé (Heredia et *al.*, 2009). Les moisissures des champs peuvent induire une décoloration des grains de blé, connue sous le nom (point noir ou tâche du noyau) causant l'échaudage des grains et l'affaiblissement ou la mort des embryons (Hanson et Christensen, 1953). Les moisissures de stockage provoquent une décoloration sévère des grains, *Aspergillus glaucus* provoque la décoloration du germe ; Les moisissures du genre *Penicillium* qui

exigent des teneurs en eau relativement élevées peuvent causer la décoloration du grain (Brooker et al., 1992).

➤ Odeur

La contamination fongique des grains de blé est responsable du rejet des odeurs indésirables. Il a été constaté que les grains stockés à des conditions d'humidité élevées ont une odeur de moisi (Mathew, 2010).

1.1.5.2. Modifications biochimiques

Au cours du stockage du blé, de nombreux changements biochimiques peuvent se produire et provoquent une diminution de la valeur nutritive du produit stocké en attaquant les glucides, les protéines, les lipides et les vitamines (Udayakumar, 2009).

➤ Dégradation des lipides

Les lipides des grains et notamment les triglycérides se révèlent particulièrement sensibles à la dégradation par les microorganismes. Les triglycérides sont hydrolysés en glycérols et en acides gras grâce à des enzymes appelés « lipases », que l'on rencontre chez les moisissures (*Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Penicillium*), les levures (*Candida*, *Pichia*) et les bactéries (*Bacillus*). Les acides gras sont dégradés chez les microorganismes aérobies et aéroanaérobies (*Pseudomonas*, *Entérobactéries*, levures, moisissures...) par la β -oxydation (Guiraud, 2003). L'évolution de l'acidité grasse est une des manifestations les plus sensibles des modifications biochimiques que subissent le blé au cours du stockage (Feillet, 2000).

➤ Dégradation des glucides

Les grains de blé se composent d'environ de 60 à 80 % de glucides (Dunford, 2012) qui comprennent à la fois des saccharides fonctionnelles et des saccharides de stockage, la plupart sous forme de polysaccharides (amidon, cellulose) qui sont non directement assimilables par les microorganismes et nécessitent l'intervention d'enzymes extracellulaires (amylases et cellulases).

➤ Dégradation des protéines

L'hydrolyse des protéines en polypeptides et en acides aminés assimilables par les microorganismes ne se fait que très lentement dans les conditions de stockage (Multon, 1982). La plupart des protéases microbiennes sont spécifiques. Elles agissent aussi bien sur les protéines que sur les oligopeptides, il s'agit des enzymes généralement exocellulaires (Guiraud, 2003).

1.1.2. Autres céréales

Les variétés de céréales les plus consommées dans le monde sont le blé dur (*Triticum sativum*), le maïs (*Zeamays*), le riz (*Oryza sativa*), l'avoine (*Avena sativa*), l'orge, (*Hordeum vulgare*), le millet (*Pennisetum glaucum*), le teff (*Eragrostistef*), le sorgho (*Sorghum bicolor*), le seigle (*Secalecereale*).

Leur importance varie selon les régions géographiques où elles sont naturellement cultivées. Ces produits à base de céréales comme le blé, le seigle, le riz, le maïs, l'orge, l'avoine, le sorgho et le millet, racines (manioc, taro), les légumes secs, pois chiche, graine de soja sont fermentés en divers produits dans différentes régions du monde et selon les traditions ancestrales (tableau 1).

1.1.3. Aliments et boissons fermentés

Une large gamme de bouillies et de boissons non alcoolisées à base de sorgho, de millet et de maïs est produite en Afrique : *ogi* (Benin, Nigeria), *togwa* (Tanzania), *bushera* (Ouganda), *bensaalga/koko* (Burkina Faso, Ghana), *gowé* (Benin), *mawé* (Benin), *kenkey* (Ghana), *hussuwa* (Sudan) et *poto poto* (République populaire du Congo) (Muyanja *et al.*, 2003; Tou *et al.*, 2006 ; Abriouel *et al.*, 2006 ; Adebolu *et al.*, 2007 ; Guyot, 2010).

De nombreux pays africains fabriquent les boissons alcoolisées à partir des céréales (après maltage).

En Asie, la fermentation du riz avec des starters mixtes a donné naissance à une grande variété de produits traditionnels (Hammes *et al.*, 2005).

Dans les Himalayas, quelques céréales sont traditionnellement fermentées en aliments comme *selroti*, *nan*, *jalebi*, *siddu*, *bhatarua*, et *seerain*. Elles sont aussi fermentées pour produire des boissons alcoolisées (Tamang, 2010d). Au Mexique et au Guatemala, le maïs est utilisé pour la production d'une boisson, non alcoolisée, dénommée *pozol* (Ben Omar and Ampe, 2000).

Tableau 1: Aliments et boissons traditionnels, à base de céréales fermentées, consommées dans différentes régions du monde (Guyot,2010).

Nom du produit	Pays d'origine	Céréales utilisées	Nature du produit fermenté	Utilisation
Ben-Saalga , Koko	Burkina Faso, Ghana	Millet de perle	Liquide	Bouillie
Behaati jaanr	Inde, Népal	Riz	Riz glutineux saccharifié	Boisson alcoolisée (douce-acide)
Boza	Roumanie, Turquie, Albanie	Blé, seigle, maïs, etc	Liquide (avec cuisson)	Boisson
Bushera	Ouganda	Shorgo, millet	Suspension	Boisson
Dosa	Inde	Riz et haricot urd	Pâte à frire	Crêpes
Gahum tojaanr	Inde	Blé, seigle, maïs, etc	Graines cuites	Boisson alcoolisée obtenue après filtration des graines
Gowé (Sifanu)	Benin	Shorgo	Liquide (avec cuisson)	Boisson
Hussuwa	Soudan	Shorgo	Pâte	Pâte comme aliment
Idli	India	Riz et haricot urd	Pâte à frire	Gâteaux cuits à la vapeur
Injera	Ethiopie	Teff; Shorgo, Eleusine, Maïs, orge	Pâte à frire	Pain plat
Kenkey	Ghana	Maïs	Pâte	Pâte cuite à la vapeur
Kisra	Golfe arabe, Soudan Irak	Shorgo, Millet de perle	Pâte épaisse à frire	Pain plat
Kodo ko jaan Y	Inde, Népal	Eleusine	Graines cuites	Boisson alcoolisée épaisse, légèrement acide obtenue après présage des graines
Mahewu	Afrique du Sud, Zimbabwe	Maïs	Suspension	Boisson
Mawé	Bénin, Togo	Maïs	Pâte	Aliments de base prêt-à-servir
Ogi	Afrique de l'ouest	Maïs, millet, shorgo	Liquide	Aliments de base prêt-à-servir
Poto poto	Congo	Maïs	Liquide	Bouillie
Pozol	Mexique, Guatémala	Maïs	Pâte cuite avec le citron vert	Boisson
Selroti	Inde, Népal, Bhoutan	Riz	Pâte à frire	Beignet
Togwa	Afrique de l'est	Maïs	Bouillie	Boisson
Ben-Saalga	Burkina Faso, Ghana	Blé, seigle	Bouillie	Aliments de base prêt-à-servir
Pain				
San Fransisco	Amérique	Blé, seigle	Pâte	Pain
Pain au levain	Europe, Australie, Amérique	Millet de perle	Pâte	Pain- Baguette

1.1.4. Blé fermenté

Le blé récolté est conservé dans les silos souterrains « matmora » (Figure 2B). Suite à l'infiltration accidentelle des eaux des précipitations dans la matmora, les grains de blé sont inondés et subissent une fermentation spontanée. L'atmosphère confinée dans la matmora engendre les phénomènes de fermentations d'origine microbienne dont la durée peut dépasser une dizaine d'années. Le hamoum (Figure 2A), issu du blé fermenté est utilisé dans la préparation de pain de blé fermenté et de couscous *lemziet*, *elmachroub*. Ces derniers sont caractérisés par une variété de saveur, de texture et d'arômes particuliers pour les consommateurs des régions spécifiques (Bekhouche et *al.*, 2013).

Les fermentations des céréales sont dominées par les bactéries lactiques. La composition et la diversité du microbiote des céréales fermentées dépendent principalement de l'environnement (végétaux, animaux et ustensiles de fabrication, entres autres) et de l'adaptation des microorganismes aux conditions de fermentation (substrats, températures, pH, activité de l'eau) (Guyot, 2010; Tamang, 2013d).

1.2. Les bactéries lactiques

1.2.1. Définition et caractéristiques des bactéries lactiques

Le groupe de bactéries lactiques constitue un groupe hétérogène dont le caractère commun est la production d'acide lactique suite à la fermentation des glucides (Labioui et *al.*, 2005). Il existe d'autres bactéries produisant de l'acide lactique mais qui ne sont pas considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques. C'est le cas par exemple, de *Bacillus* et de *Sporolactobacillus* qui sont des bactéries Gram (+) sporulées (Axelsson, 2004).

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes en forme de coques ou de bâtonnets, Gram-positif, incapables de produire la catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase), généralement immobiles et asporulées (Dellagio et *al.*, 1994). En présence d'oxygène elles sont incapables de phosphorylation oxydative. De nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, facteurs de croissance, peptides, base purique et pyrimidique, des vitamines B et des acides gras. Elles ont également une activité aromatique très importante d'où leur utilisation en agroalimentaire (Leveau et *al.*, 1991). Sur la base des caractéristiques de fermentation, les bactéries lactiques sont homofermentaires ou hétérofermentaire (Dortu, 2008), et tolèrent des pH acides. Cette dernière propriété est utilisée en agroalimentaire pour acidifier le milieu et empêcher le développement des bactéries pathogènes et d'altérations (Nielsen et *al.*, 2008).

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, elles sont présentes dans de différentes niches écologiques comme le lait, les produits laitiers, les végétaux, la viande, les muqueuses humaines et animales (Drouault et Corthier, 2001). Elles ont également été retrouvées dans le sol, les engrais, et les eaux d'égout (Holzapfel et *al.*, 1996 cités par Givry et Duchiron, 2008).

Elles sont généralement mésophiles mais certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent majoritairement à pH 4,0-4,5 et certaines sont encore actives à des valeurs de pH extrêmes comme 9,6 ou 3,2. Elles possèdent des tolérances très variables vis-à-vis du NaCl et possèdent de faibles activités protéolytiques et lipolytique (Caplice et Fitzgerald, 1999). Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se font attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS « Generally Recognized As Safe ». Cependant, quelques espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes (Collins et Aguirre, 1993).

Dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermentés, fromage). Les différentes espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis* et/ou

Lactococcus garvieae, les plus rencontrés dans le lait et le fromage sont communément utilisés comme ferments (« starter culture ») par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers. Elles sont à l'origine de la fermentation pour la préparation de nombreuses boissons à partir de plantes (boza, cidre), céréales (maïs, sorgho). Acidotolérantes, les bactéries lactiques sont capables de survivre dans des milieux très acides en raison de leur production d'acide lactique. De plus, l'acidification du milieu participe à l'inhibition de la croissance de certains microorganismes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes* (Ennahar et al., 1998).

1.2.2. Classification des bactéries lactiques

Depuis la description du genre *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*), la taxonomie des bactéries lactiques est en évolution permanente. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (Pot, 2008).

La classification des bactéries, des levures, des virus et des protistes est basée sur la taxonomie polyphasique. C'est Colwell (Colwell, 1970), qui a introduit ce terme en se référant à une taxonomie basée sur un ensemble de critères regroupant les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques (Pot, 2008).

La première classification des bactéries lactiques a été établie par Orla-Jensen (1919) basée sur les méthodes phénotypiques classique (morphologique, biochimique et physiologique) demeure pratique dans l'identification préliminaire des microorganismes (Lahtinen et al., 2011). Les bactéries étaient donc classées en fonction de la morphologie pour décrire et classifier les genres des bactéries lactiques. De ce fait, elles peuvent être divisées arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (Ho et al., 2007). Les données biochimiques et physiologiques incluant la production de gaz à partir du glucose (Sperber et Swan, 1976), la croissance à différentes températures, la tolérance au NaCl, aux acides, à la bile, l'hydrolyse de l'arginine à la détermination du profil d'hydrolyse des sucres et à la configuration de l'aide lactique ont été utilisées pour discriminer les microorganismes les plus proches (Ho et al., 2007).

Ces méthodes se sont ensuite étendues par l'étude des marqueurs chimio-taxonomiques comme la composition de la paroi cellulaire bactérienne (De Ambrosini et al., 1996) incluant la nature des acides gras, tels que l'acide lactobacillique et les acides gras insaturés qui la composent (Gilarova et al., 1994).

Avec l'avènement de la biologie moléculaire, de nouvelles techniques se développèrent telle que l'hybridation ADN/ADN, le séquençage de l'ARN 16S de gènes codant des protéines, de protéines ribosomales ou d'études plus poussées du génome ont été incorporés à la description d'une espèce. La combinaison des méthodes chimio-taxonomiques, moléculaires et physiologiques ont permis d'approcher la taxonomie bactérienne sous un autre angle.

En effet, ces méthodes ont changé la taxonomie des bactéries lactiques de façon significative. Selon les travaux de phylogénie (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Klein et *al.*, 1998), les bactéries lactiques appartiennent au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales*. L'ordre de *Lactobacille* regroupe six familles (*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuococcaceae* et *Streptococcaceae*) formées de plusieurs genres dont 15 seulement forment le groupe lactique *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Alloicoccus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella* et *Tetragenococcus*. Parmi ces bactéries lactiques, neuf premiers genres sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire (Leisner et *al.*, 2000).

Les relations phylogénétiques de ces principales bactéries lactiques, basées sur la comparaison des séquences d'ARNr 16S, montrent que *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Lactosphaera* sont étroitement apparentés les uns aux autres. *Lactococcus* et *Streptococcus* apparaissent comme relativement apparentés, alors que *Lactobacillus* est phylogénétiquement distinct (Figure 3).

De nouveaux genres, par exemple *Isobaclum*, *Ermococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum*, *Apoqobacter*, *Abiotrophia*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Trichococcus* *Marinilactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Oscillospira*, ont également été décrit, et montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec les groupe des bactéries lactiques (Ennahar et *al.*, 2003, Makarova et Koonin, 2007).

Récemment, deux nouvelles espèces *Lactobacillus nasuensis* sp. nov. et *Lactococcus fujiensis* sp. nov. ont été isolées respectivement d'ensilage de sorgho et de feuilles de choux chinois et caractérisées phénotypiquement et taxonomiquement (Cai et *al.*, 2011a ; Cai et *al.*, 2011b). Les bactéries lactiques représentent ainsi un groupe taxonomique, physiologique et phylogénique très divers.

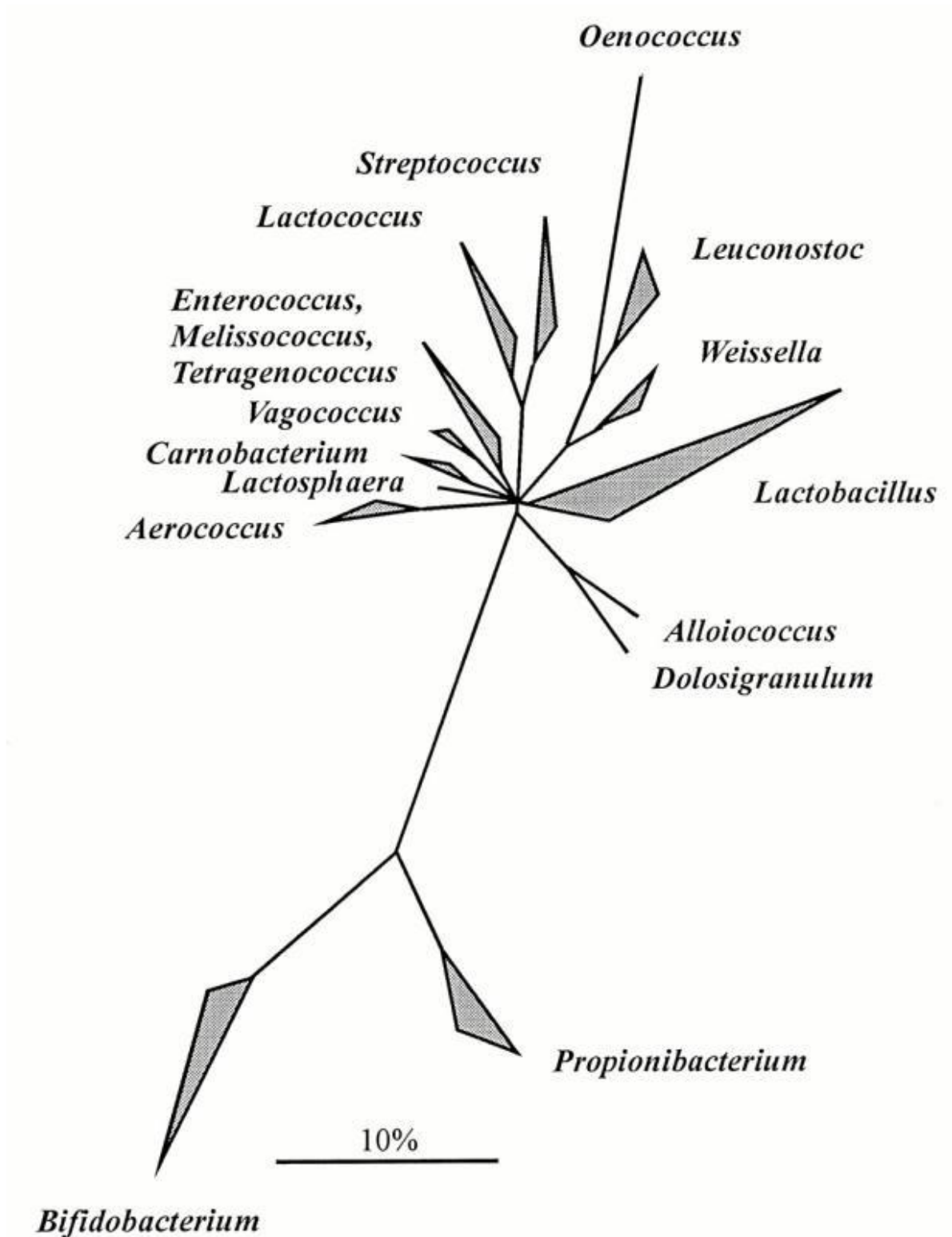


Figure 3: Arbre phylogénétique consensus, basé sur la comparaison de séquence d'ARNr 16S, montrant les principaux groupes de bactéries lactiques, ayant un faible contenu mol% de G+C de l'ADN ainsi que les bactéries Gram positives non reliées des genres *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfel et al., 2001).

1.2.3. Caractéristiques des principaux genres de bactéries lactiques

1.2.3.1. Genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* a été proposé par Beijerinck en 1901. Il compte à ce jour plus de cent espèces, largement répandues dans les règnes animales et végétales. Elles sont caractérisées par leur hétérogénéité : le pourcentage GC varie de 32 à 53%. De par leur variété, elles sont présentes dans des milieux très différents : laits fermentés comme le kéfir, végétaux fermentés comme la choucroute, les viandes fraîches ou fermentées, l'ensilage ou le vin, le tube digestif de l'homme et des animaux (Guiraud, 2003 ; Galvez *et al.*, 2008). Ces bactéries ont une forme de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, généralement immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth., 1990 ; Leclerc *et al.*, 1994).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé selon leur type fermentaire en trois groupes selon la classification de Orla-Jensen en trois groupes remaniée par Kandler et Weiss ; et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (Tamime, 2002).

➤ Groupe I « *Thermobacterium* »

Il comprend les lactobacilles homofermentaires stricts, la plupart étant thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Ce groupe est constitué majoritairement d'espèces présentes chez l'homme et les animaux et qui participent à l'équilibre de la microflore de l'organisme. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*

➤ Groupe II « *Streptobacterium* » :

Il regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Ils métabolisent le glucose en acide lactique grâce à la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas et dégradent les pentoses par la voie hétérofermentaire des pentoses phosphate. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate (Kandler et Weiss, 1986 ; Stiles et Holzappel., 1997). Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum* (Figure 4).

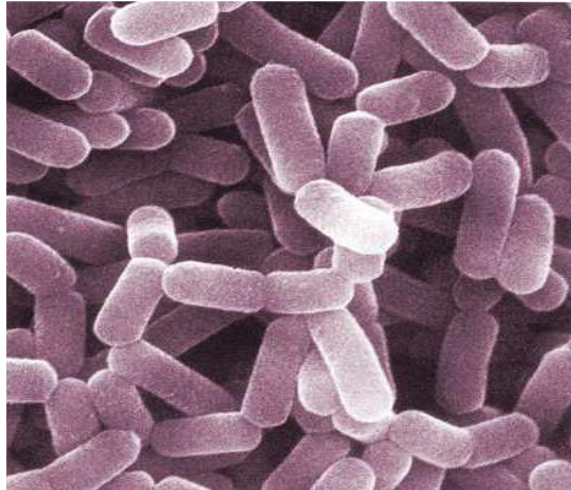


Figure 4 : *Lactobacillus casei* au microscope électronique (Corrieu & Luquet, 2008).

➤ Groupe III «*Betabacterium* » :

Ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfrancisco*.

1.2.3.2. Genre *Lactococcus*

La première espèce de *Lactococcus* décrite fut *Bacterium lactis* par Lister (1873). Elle fut ensuite renommée *Lactococcus lactis* par Schleifer et al. (1985). Le genre *Lactococcus* comprend 7 espèces et 4 sous espèces (Euzéby, 2011).

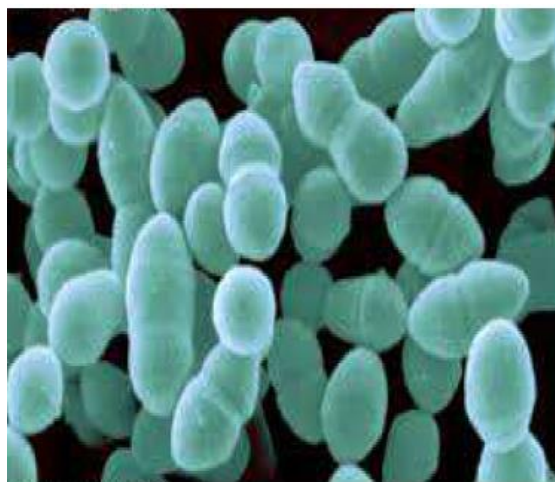


Figure 5 : *Lactococcus lactis*, au microscope électronique (Corrieu et Luquet, 2008).

Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (Pilet et al., 2005).

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique L(+), seul *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar. *Diacetylactis* produit le diacétyl. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines (Tamime, 2002). Cependant, l'espèce *Lactococcus lactis* (Figure 5) trois sous espèces ont été attribuées : *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Seules les deux premières *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* sont importantes dans l'industrie laitière (Axelsson, 1998).

1.2.3.3. Genre *Streptococcus*

Les espèces de *Streptococcus* ont été parmi les premières bactéries à être reconnues par les microbiologistes en raison de leur implication dans un grand nombre de maladies humaines et animales (Brown, 1919 ; Schottmüller, 1903).

Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plupart des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer, 1987).

Les cellules sont généralement, de formes sphériques ou ovoïdes disposées par paires, en tétrades ou en chaînettes. Il est difficile de distinguer ce genre des *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus* sur une base morphologique (Wijtzeset *al.*, 1997).



Figure 6 : *Streptococcus thermophilus*, au microscope électronique (Corrieu et Luquet, 2008).

L'espèce *Streptococcus thermophilus* (Figure 6), largement présente dans le lait et les produits laitiers comme agent d'acidification, possède le statut GRAS (Generally Recognized As

Safe) Cette espèce se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène.

La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les st. thermophilus de la plupart des autres streptocoques (Pilet et *al.*, 2005). L'espèce *Streptococcus thermophilus* (Figure 6), largement présente dans le lait et les produits laitiers comme agent d'acidification, possède le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) et est utilisée dans certains produits probiotiques.

1.2.3.4. Genre *Enterococcus*

Ce genre forme des coques, généralement groupés isolés, en paires, en chaînettes ou en amas et leur morphologie peut varier selon les conditions de culture (Devriese et *al.*, 1993).

Par ailleurs, il est caractérisé par ses capacités à croître à des valeurs de pH élevées, de résister à l'acidité, et de se développer en présence de concentrations salines élevées (Ruiz-Moyano et *al.*, 2008).



Figure 7 : *Enterococcus faecalis* au microscope électronique (Wallace et *al.*,2003).

Les espèces du genre *Enterococcus* se caractérisent par leur grande résistance aux facteurs environnementaux. Elles sont présentes notamment dans l'intestin de l'Homme et des animaux, les produits végétaux, le sol et les produits laitiers. Les espèces *Enterococcus faecalis* (Figure 7) et *Enterococcus faecium*, anciennement désignées « streptocoques fécaux » sont toutes les deux utilisées comme probiotiques.

1.2.3.5. Genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînettes mésophiles (Figure 8) qui possèdent un caractère hétérofermentaires marqué, avec production d'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrans, les conditions de croissance, la capacité à croître à différents pH et température, l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Ho et al., 2007).

Actuellement, le genre *Leuconostoc* comprend quatorze espèces, ils sont également anaérobies facultatifs et exigeants au point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente. Le développement des *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu grâce à la production des exopolysaccharides. Le genre *Leuconostoc* principalement *Ln. mesenteroides* sp.cremoris et *Ln. lactis* sont utilisés en association avec les lactocoques dans l'industrie laitière pour produire en plus de l'acide lactique et le CO₂, des substances aromatiques telles que le diacétyl et l'acétoïne à partir des citrates du lait (Guiraud, 2003 ; Ogier et al., 2008).

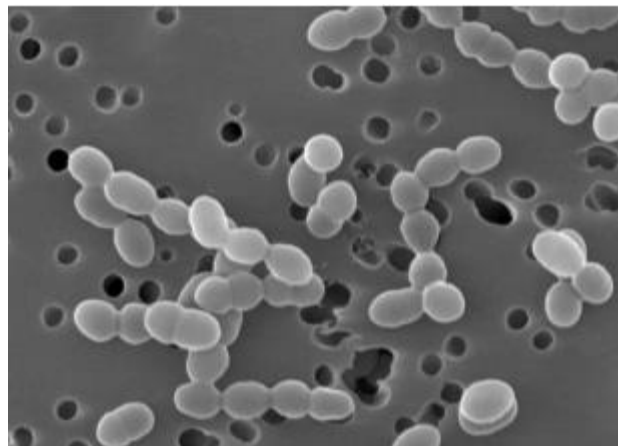


Figure 8 : *Leuconostoc mesenteroides* au microscope électronique. (Wallace et al., 2003)

Récemment, l'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été classée dans un nouveau genre *Oenococcus oeni* et certaines espèces de lactobacilles hétérofermentaires ont été groupées avec *Leuconostoc paramesenteroides* dans le nouveau genre *Weissella* (Stiles et Holzapfel, 1997).

1.2.3.6. Genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Le genre *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade (Figure 9). Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance (Simpson et Taguchi, 1995). Les bactéries appartenant à ce genre productrices de bactériocines ne sont pas

adaptées à la fabrication des produits laitiers fermentés de par leur manque ou leur lenteur de fermentation du lactose (Papagianni et Anastasiadou, 2009). En revanche, la souche *Pediococcus acidilactici* productrice de pédiocine PA—1/AcH s’est révélée être responsable de la bonne conservation de la viande en diminuant les populations de *Listeria monocytogenes* et de *Clostridium perfringens* (Rodriguez et al., 2002). Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu’à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

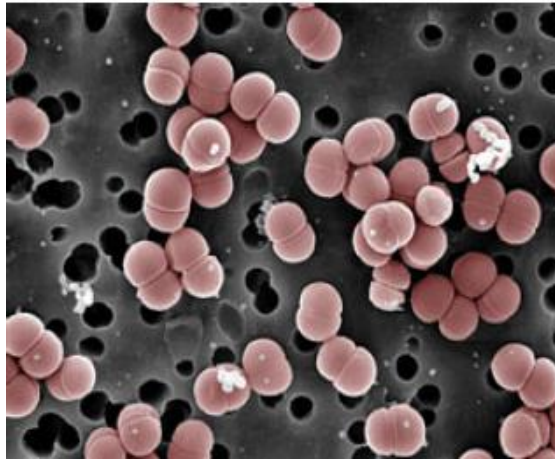


Figure 9 : *Pediococcus* au microscope électronique. (Wallace et al., 2003)

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les pedicoques sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (Tosukhowong et al., 2005).

1.2.3.7. Genre *Bifidobacterium*

Traditionnellement, le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu G+C > mol 50% et affecté au phylum des *Actinobacteria* (Gomez et Malcata, 1999 ; Leahy et al., 2005). Néanmoins, les bifidobactéries sont également considérées comme des bactéries lactiques, en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables et du fait qu’elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques tel que le tractus gastro-intestinal (Klein et al., 1998). En effet, elles ont généralement un pH optimal de croissance autour de 6.5 à 7 et une température de croissance comprise entre 37°C et 41°C. Elles ont la forme irrégulière d’un V ou une morphologie bifide en forme de Y (Figure 10). Elles sont hétérofermentaires et dégradent les hexoses en produisant de l’acide lactique et acétique (Gomez et Malcata, 1999 ; Leahy et al., 2005).

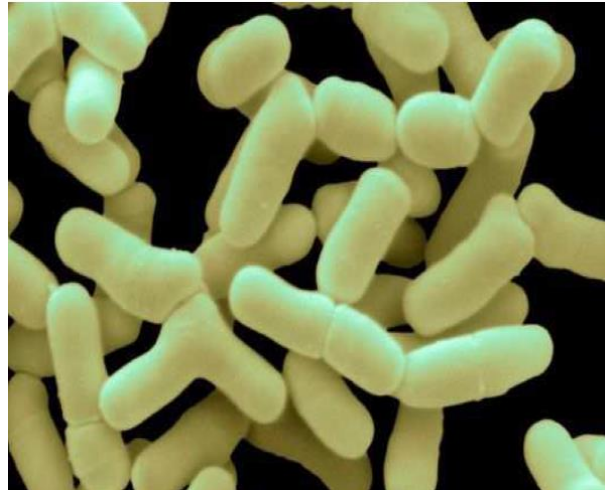


Figure 10 : *Bifidobacterium sp* (Wallace et al., 2003)

Les espèces de *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve* et *bifidobacterium longum* se trouvent dans l'intestin des enfants et des adultes.

1.2.4. Métabolisme des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent des microorganismes appartenant à plusieurs genres ayant la capacité de fermenter les sucres en acide lactique. Les sucres peuvent être des monosaccharides tels que les hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), des hexitols ou des pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des dissaccharides (lactose, saccharose, cellobiose, maltose, tréhalose). La capacité à métaboliser les sucres est fonction des souches considérées.

En règle générale, le produit final prédominant est l'acide lactique (50% de carbone de sucre). Il est clair, cependant, que les bactéries lactiques s'adaptent à diverses conditions en changeant leur métabolisme par conséquent. Cela peut conduire à former différents modèles de produits finis (Axelsson, 2004).

1.2.4.1. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (Atlan et al., 2008) :

- Le transport du sucre à travers la membrane cellulaire ;
- Le catabolisme intracellulaire du sucre ;
- Formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

Pour pénétrer dans la cellule, les sucres doivent d'abord franchir la membrane cellulaire qui possède une perméabilité sélective : elle laisse passer les composés apolaires par diffusion mais se

révèle imperméable aux composés polaires hydratés. Deux systèmes de transport actifs des sucres sont présents chez les bactéries lactiques : le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS), qui couple le transport et la phosphorylation du glucide (phosphorylation en cascade), et le système perméase énergie-dépendant, qui fait pénétrer les glucides sous forme de sucres libres (Thompson, 1987).

Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (Figure 11). Il s'agit des voies homofermentaire (Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (Atlan *et al.*, 2008).

1.2.4.2. Voie homofermentaire ou EM

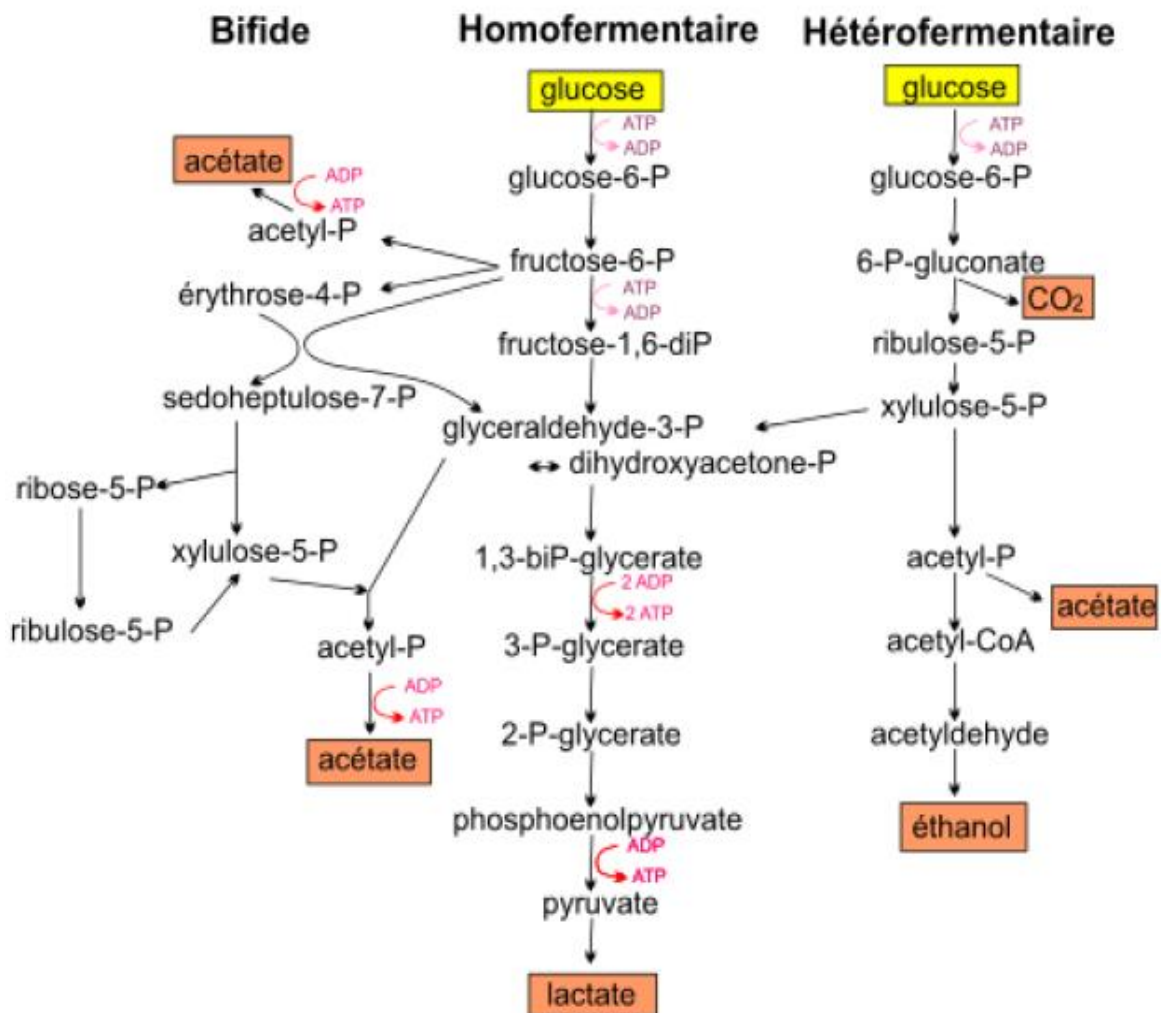


Figure 11 : Différents types de fermentation (Axelsson, 2004)

La voie homofermentaire emprunte la glycolyse dans sa totalité (du glc-6-P jusqu'au pyruvate) et est généralement associée aux bactéries des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, et *Lactobacillus*. La glycolyse conduit, en conditions optimales de croissance, à la production de 2 molécules de lactate et 2 molécules d'ATP par molécule de glucose. Ce métabolisme est qualifié d'homolactique lorsqu'au moins 90% du glucose consommé est converti en lactate. La fructose-1,6-biphosphata aldolase (FBA) est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (Thompson et Gentry-Weeks, 1994). En conditions de croissance non optimales (limitation de carbone ou certains sucres), le métabolisme des bactéries homofermentaires peut se diversifier vers un métabolisme appelé mixte, avec production, en plus du lactate, de formiate, ou/de CO₂, d'acétate et d'éthanol (Cocaign-Bousquet et al.1996) (Figure 12). Cette fermentation est essentiellement réalisée par les entérobactéries (*Enterococcus* sp.).

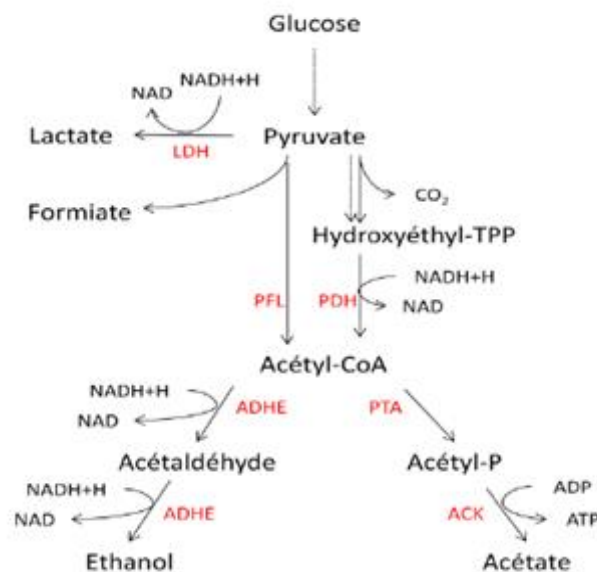


Figure 12 : Schéma de la fermentation des acides mixtes (Cocaign- Bousquet et al., 1996

Les principales enzymes sont indiquées en rouge : LDH : lactate déshydrogénase, PFL : pyruvate formiate lyase, PDH : pyruvate déshydrogénase, PTA : phosphotransacétylase, ACK : acétate kinase, ADHE : alcool déshydrogénase.

1.2.4.3. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate

Les principaux groupes de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc* telles que *Leuconostoc mesenteroides* (*Ln. mesenteroides*) et *Leuconostoc pentosaceus* et certains

Lactobacillus tels que *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermenti*. Ce groupe de bactéries dégrade les hexoses en empruntant la voie hétérofermentaire communément appelée voie des pentoses phosphate (Figure 11) qui conduit à la formation d'une molécule d'acide lactique, d'une molécule d'éthanol et d'une molécule de CO₂ (Kandler, 1983). Les sucres à cinq atomes de carbone ou pentoses, comme le fructose, peuvent parfois être fermentés et donnent alors une molécule d'éthanol et une molécule d'acide lactique. Outre ces produits, qui représentent plus de 80% des métabolites obtenus, on obtient également de l'acide acétique et du glycérol.

Chez les bactéries hétérofermentaires et selon les conditions environnementales, le pyruvate peut aussi former d'autres composés, comme l'acétate, l'éthanol ou encore des composés responsables des arômes des produits laitiers (diacétyl, acétoïne, 2,3-butanediol, α -acétolactate) (Loubiere & Coccagn-Bousquet, 2009).

1.2.4.4. Voie bifide ou FPC (Fructose 6- phospho- céto-lase)

Cette voie est empruntée par les bactéries du genre *Bifidobacterium*, elle permet d'avoir 1.5 molécules d'acétate et 2.5 molécules d'ATP à partir d'une molécule d'hexose consommée. (Figure 11).

1.2.5. Intérêts des bactéries lactiques

Le principal atout que représentent les bactéries lactiques pour l'industrie alimentaire réside dans l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques et en augmentant leur durée de conservation (Stiles et Holzpafel, 1997). Elles participent à l'inhibition de certains microorganismes pathogènes, en produisant des métabolites ayant une activité antimicrobienne (Dortu et Thonard, 2009).

1.2.5.1. Dans la biopréservation

La technologie de biopréservation utilisant des bactéries lactiques inhibitrices constitue un outil supplémentaire au service des industriels qui peut contribuer à l'amélioration de la qualité et de la sécurité microbiologique. Elle constitue une alternative pour la conservation des produits réfrigérés qui ont une durée de conservation de plusieurs jours à plusieurs semaines. Cependant, leur application exige une sélection ciblée des souches permettant de répondre au mieux aux caractéristiques des produits (Pilet *et al.*, 2005).

1.2.5.2. Dans l'industrie alimentaire

L'implication des bactéries lactiques dans la fermentation et la bioconservation des aliments est connue depuis très longtemps. Les souches de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* sont utilisés pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés (Yateen et al., 2008). Les bactéries lactiques sont aussi responsables de l'ouverture des fromages par production de CO₂, de la texture produits fermentés, par production des exopolysaccharides ainsi que de la production de peroxyde d'hydrogène ou de bactériocines qui inhibent la croissance de bactéries indésirables (Doleyres, 2003).

L'utilisation des bactéries lactiques a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et par conséquent augmenter la durée de leur conservation sans ajout de conservateurs chimiques.

1.3. Les activités antimicrobiennes des bactéries lactiques

Parmi les principaux atouts des bactéries lactiques est la préservation des qualités nutritionnelles et organoleptiques des produits alimentaires et l'augmentation de la durée de conservation (Abee, 1995 ; Hugenholtz et *al.*, 1999). En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl, la reutérine et les bactériocines.

1.3.1. Les acides organiques

Les acides organiques comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique sont produits par les bactéries lactiques lors du processus de fermentation alimentaire et permettent d'inhiber la croissance des bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide. Sous la forme indissociée, l'acide lactique et l'acide acétique traversent passivement la membrane cytoplasmique et, pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel, que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire est annulé (Ammor et *al.*, 2006). Ainsi, l'accumulation d'acide organique est directement inhibitrice pour les microorganismes nuisibles qui présentent un seuil bas de résistance aux changements de pH intracellulaire (Kashet, 1987).

En milieu tamponné, les acides lactique et acétique peuvent avoir des effets synergiques sur certaines espèces comme *E. coli* (Adams et Hall, 1988).

La sensibilité à ces acides dépend des bactéries et de l'action simultanée d'autres facteurs tels que : l'activité de l'eau et la température (Hsiao et Siebert, 1999).

La production des acides lactique et acétique et donc l'abaissement du pH ont un effet essentiellement sur les microorganismes acido-sensibles tels que *Pseudomonas*, *Salmonella*, *E. coli* et *Clostridium*. L'acide lactique est toxique pour beaucoup de bactéries mais aussi des champignons et des moisissures (Geis, 1989 ; Piard et Desmazeaud, 1991).

L'acide lactique n'est pas le seul acide inhibiteur. En effet, quand l'aliment contient peu de sucres, l'inhibition sera partiellement causée par d'autres produits tels que l'acide formique, l'acide benzoïque et le diacétyl (Helander et *al.*, 1997).

1.3.2. Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques ne possèdent généralement pas de catalase. L'accumulation du peroxyde d'hydrogène sous l'action des oxydases est la cause majeure de la présence de l'activité

antimicrobienne, notamment chez les lactobacilles (Daeschel, 1989). L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène est principalement due à son fort effet oxydant sur les lipides membranaires et les protéines cellulaires (Caplice et Fitzgerald, 1999).

1.3.3. Le dioxyde de carbone

Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone (CO₂) comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Son accumulation dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité membranaire (Ammor et al., 2006).

1.3.4. Le diacétyle

Le diacétyle est un produit du métabolisme du citrate qui est responsable de l'arôme des produits laitiers. Plusieurs genres des genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus* peuvent synthétiser le diacétyle (Leveau et al., 1991). Les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures sont plus sensibles au diacétyle que les bactéries Gram positif (El-Ziney et al., 1998).

1.3.5. La reutérine

La reutérine (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est un métabolite intermédiaire qui possède un effet antimicrobien. Il est produit lors de la fermentation anaérobique du glycérol par certaines espèces de *Lactobacillus*, notamment *Lactobacillus reutei* (Vollenweider, 2004).

La reutérine est également produite par des genres bactériens non lactiques tels que *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Clostridium* (Vollenweider, 2004).

La reutérine possède un large spectre d'activité et a des applications dans le domaine médical et alimentaire.

1.3.6. Les bactériocines

Le terme **bactériocine** a été utilisé pour désigner les protéines et peptides antimicrobiens synthétisés selon la voie ribosomique. Plus précisément, les bactériocines sont considérées comme des substances protéiques présentant une activité antimicrobienne. Ainsi les bactériocines, peuvent être isolées chez de nombreuses bactéries et archées (Klaenhammer, 1988).

Aujourd'hui, les bactériocines désignent le plus souvent des protéines ou complexes de protéines produits par les bactéries Gram positif et plus particulièrement les bactéries lactiques (Klaenhammer 1988). Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens le plus souvent cationiques, modifiés ou non post-traductionnellement, de masses moléculaires comprises entre 2 et 6 kDa (Heng *et al.*, 2007a).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont généralement actives à faible concentration contre des bactéries phylogénétiquement proches (Belguesmia *et al.*, 2011, Cotter *et al.*, 2005b). Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques ayant une activité contre des bactéries Gram négatif n'a été décrite, la membrane externe de ces dernières ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité. Cependant, plusieurs genres de bactéries à Gram négatif tels que *Haemophilus*, *Helicobacter* ou *Neisseria* se sont révélés être sensibles à certaines de ces bactériocines (Morency *et al.*, 2001).

L'activité antimicrobienne des bactériocines a un effet soit bactéricide, provoquant la mort de la bactérie cible, soit bactériostatique inhibant la croissance bactérienne. Les bactériocines les plus étudiées sont celles produites par les bactéries lactiques connues pour leur rôle dans la bonne conservation des aliments (Cotter *et al.*, 2005b).

1.3.6.1. Nomenclature et classification des bactériocines

Les bactériocines sont produites par plusieurs genres de bactéries lactiques : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* (Klaenhammer 1988 ; Piard et Desmazeaud, 1992), *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* (Devuyst et Vandamme, 1994) et *Bifidobacterium* (Meghrouh *et al.*, 1999).

La nomenclature des bactériocines est basée sur le générique du genre ou de l'espèce productrice (Leclerc *et al.*, 1995). Par exemple, l'espèce *Escherichia coli* produit une bactériocine nommée colicine. L'espèce *Pediococcus* produit une bactériocine nommée pediocine.

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes selon les caractéristiques communes telles que le poids moléculaire, les propriétés physicochimiques, leur mode d'action (large ou restreint), leurs propriétés génétiques et leur stabilité thermique (Klaenhammer, 1993; Drider *et al.*, 2006).

Tableau 2 : Classification des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif (Cotter et al., 2005a).

Classification	Caractéristiques	Sous-classe	Exemples
Classe I (lantibiotiques)	Peptides contenant des acides aminés modifiés	Type A (linéaire) Type B (globulaire) Type C (multicomposant)	Pep5, Epidermine, Nukacine ISK-1 Mersacidine Staphylococcine C55
Classe II	Peptides contenant des acides aminés non modifiés	IIa (<i>pediocin-like</i>) IIb (multicomposant) IIc (divers)	Pédiocine PA-1 Auréocine A70, Lactacine F Auréocine A53, Lactococcine A, Divergicine A
Classe III	Protéines sensible à la chaleur	Type IIIa (bactériolysines) Type IIIb (non lytique)	Lysostaphine Helvéticine J
Classe IV	Peptides cycliques	-	Entéroccine AS-48

❖ Classe I : Les lantibiotiques

Ce sont des peptides de taille inférieure à 5kD, synthétisés par voie ribosomique et subissant des modifications post-traductionnelles importantes. Ces peptides sont caractérisés par la présence de résidus modifiés de type lanthionine (Guder et al., 2002).

La structure de ces bactériocines diffère selon la localisation des ponts établis entre les acides aminés inhabituels (Tossi et Sandri, 2002). Les lantibiotiques sont actifs contre de nombreuses bactéries pathogènes, comme *Listeria* ou *Salmonella*, responsables d'infections. Cette particularité permet aux lantibiotiques d'être utilisés comme conservateurs alimentaires (Cotter et al., 2005b).

Il existe deux types de lantibiotiques selon leur structure et leur mode d'action. En effet on a la classe Ia qui est composée de polypeptides cationiques, linéaires, hydrophobes contenant jusqu'à 34 acides aminés et dont la plus connue est la nisine et la classe Ib qui regroupe les

bactériocines globulaires non chargées ou nulle contenant jusqu'à 19 acides aminés (Twomey *et al.*, 2002), dont la plus connue est la mersacidine. Certains lantibiotiques sont par ailleurs constitués de deux peptides agissant ensemble pour avoir une activité comme la lacticine 3147.

Les lantibiotiques ont principalement la membrane cytoplasmique pour cible. Pour les lantibiotiques, l'effet antimicrobien est le résultat à la fois de la perméabilisation de la membrane cytoplasmique et de l'inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne ou de l'inactivation d'une enzyme essentielle à la biosynthèse de la paroi bactérienne (Chatterjee *et al.*, 2005a ; Twomey *et al.*, 2002).

Les lantibiotiques interagissent avec la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques ou par la liaison à des récepteurs spécifiques tels que le lipide II, précurseur du peptidoglycane. Suite à cette liaison, les lantibiotiques vont provoquer la formation de pore dans la membrane cytoplasmique entraînant l'efflux rapide de petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP, etc. Cette augmentation de la perméabilité membranaire va entraîner la mort cellulaire (Bauer et Dicks, 2005 ; Patton *et al.*, 2005).

Les lantibiotiques composés de deux peptides tels que la lacticine 3147, agissent également par la formation de pores dans la membrane des cellules cibles (Mc Auliffe *et al.*, 2001).

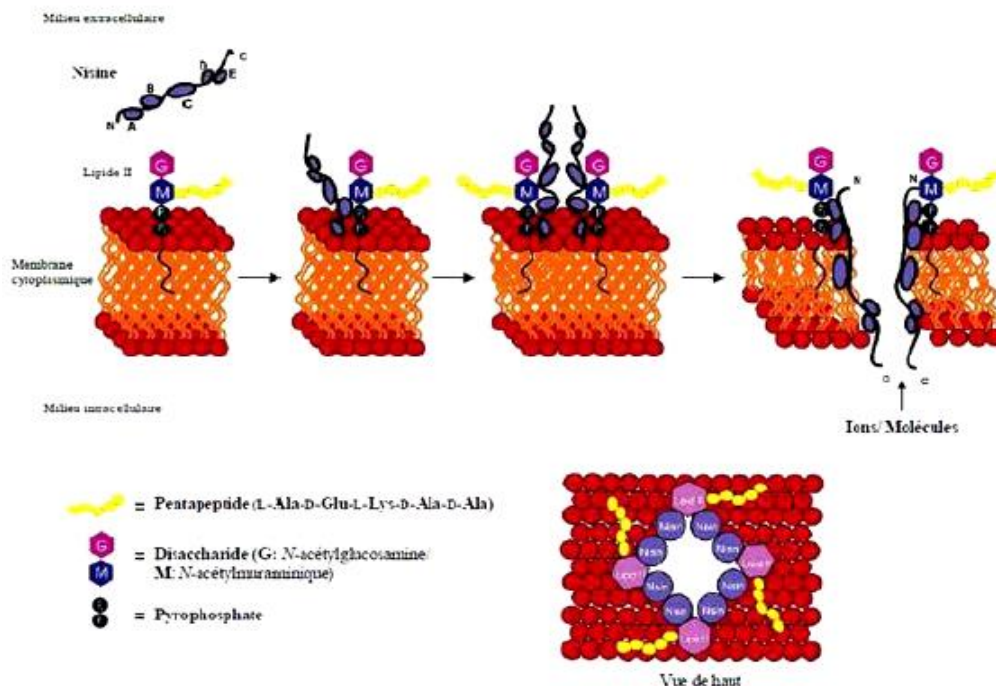


Figure 13 : Formation de pores membranaires par le complexe nisine-lipide II, (Chatterjee *et al.*, 2005a).

❖ Classe II

Cette classe regroupe les peptides dont le poids moléculaire est inférieur à 10kDa, sont stables à la chaleur et dépourvues de lantionine. Ces bactériocines ne contiennent pas d'acides aminés modifiés. Cette classe est divisée en quatre sous-classes.

Sous-classe II-a : Les bactériocines de cette sous-classe contiennent entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N- terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C- terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Fimland et al. 2000 ; Richard et al., 2006). Elles ont toutes une activité contre les souches de *Listeria*, certaines bactériocines de cette sous-classe contiennent également un deuxième pont disulfure dans leur domaine C-terminale qui semble être important dans la stabilisation de la structure tertiaire. Par ailleurs, il semble qu'il leur conférerait une meilleure activité antimicrobienne et une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures et un spectre d'action plus large (Dridier et al., 2006).

Sous-classe II-b : comprend les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Ces derniers doivent être présents en quantités approximativement équivalentes pour obtenir des activités optimales ((Nissen- Meyer et al., 1992 ; Allison et al., 1994, Richard et al., 2006).

Les gènes structuraux qui codent pour de tels peptides sont habituellement situés un à la suite de l'autre, dans un même opéron (Allison et al., 1994 ; Diep et al., 1996, Richard et al., 2006). Les bactériocines appartenant à cette sous-classe sont la lactacine F, la lactococcine G, la plantaricine E/F, J/K et S et la thermophiline 13.

Sous-classe II-c : regroupe les bactériocines activées par des thiols et n'appartenant ni à la classe II-a, ni à la classe II-b (Klaenhammer, 1993).

Sous-classe II-d : les bactériocines qui ne peuvent être regroupées dans les trois premières sous-classes.

Le mécanisme d'action supposé des bactériocines de classe IIa est l'interaction de la bactériocine avec la membrane ou un récepteur, la mannose perméase, pour ensuite former un pore dans la membrane de la cellule ce qui induit la perméabilisation de la membrane et la mort de la cellule (Dalet et al., 2000, Bauer et Dick.,2005). Le mécanisme de formation des pores n'est pas connu même si l'hypothèse la plus courante est l'assemblage de différentes molécules de la bactériocine (Diep et al., 2007). Les pores formés par les bactériocines de la classe IIa causent la perte d'ion potassium ainsi que d'acides aminés et d'autres molécules de faible poids moléculaire ce

qui dissipe les deux composantes de la force proton motrice (Bauer et *al.*, 2005). Les bactériocines de la classe IIb ont en général un spectre d'action inhibant un large éventail de bactéries Gram positif. Elles forment des pores rendant la membrane perméable à différentes petites molécules (Oppegard et *al.*, 2007a).

❖ Classe III

Ce sont des protéines de taille supérieure à 30kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Streptococcus zooepidermicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Nilsen et *al.*, 2003 ; Papagianni, 2003 ;Nigutova, 2007).

Le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des bactériocines des autres classes. En effet, l'enterolysin A, la zoocin A et la millericin B agissent par hydrolyse des liens peptidiques du peptidoglycane des cellules sensibles. La zoocin A a un spectre d'action étroit alors que l'enterolysin A et la millericin B possèdent un spectre d'action large (Nilsen et *al.*, 2003).

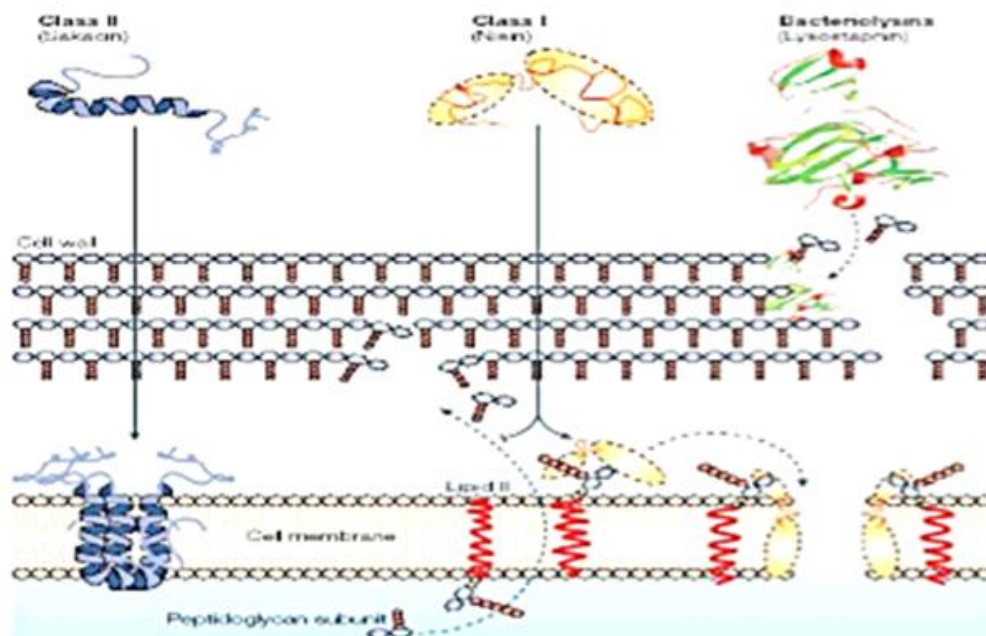


Figure 14 : Mode d'action des différentes classes de bactériocines (Cotter et *al.*, 2005a).

❖ Classe IV

Cette classe comporte les bactériocines composées d'une partie non protéique nécessaire à l'activité inhibitrice (sucre ou lipide). La classe IV a été ajoutée suite à l'observation de la perte d'activité de certaines bactériocines après leur incubation en présence d'enzymes dégradant les sucres et les lipides (Jiminez-Diaz *et al.*, 1993).

1.3.6.2. Propriétés des bactériocines

Toutes les bactériocines possèdent une protéine responsable de leur activité biologique (Tagg *et al.*, 1976). Elles peuvent être soit de composition simple constituée uniquement de protéine telle que la nisine et la lactine 481, soit de composition complexe par la présence de lipides de carbohydrate additionnés à la protéine telle que la lactine 27 (Upreti et Hinsdill, 1975). La plupart des bactériocines peuvent être lyophilisées sans perte de leur activité (Houlihan et Russell, 2006) La température, le pH et la digestion enzymatique sont les principaux facteurs qui affectent la stabilité des bactériocines Les bactériocines présentent une sensibilité aux enzymes protéolytiques telles que la trypsine, l' α - chymotrypsine, la papaïne et la pepsine (Piard et Desmazeaud, 1992). Les bactériocines se fixent spécifiquement aux récepteurs à la surface des cellules cibles et les tuent par altérations des liaisons membranaires- enzymes entraînant la destruction du potentiel membranaire par la formation de pore ou par digestion enzymatique du RNA et/ou DNA (Venugopal, 2011). Il existe des bactériocines qui sont sensibles aux enzymes non protéolytiques (lipase et α -amylase).

Les bactériocines de très faible poids moléculaire sont très thermostables montrant une grande stabilité à des traitements thermiques élevés tels que l'autoclavage (20mn) (Sarika *et al.*, 2010), à l'opposé de celle qui sont de poids moléculaire élevé qui sont très sensibles (Alves *et al.*, 2006 ; Albano *et al.*, 2007).

Les variations de pH ont un effet marquant sur la stabilité des préparations bactériocinogénique. Les bactériocines sont généralement stables dans les milieux acides et neutres. En revanche, elles perdent leur stabilité en milieu basique. C'est le cas de la nisine qui perd sa stabilité à 80% à pH 10 (Piard et Desmazeaud, 1992, Kostinek *et al.*, 2007).

L'activité de la bactériocine issues des bactéries lactiques mésophiles n'est pas affectée par la variation du pH allant de 2 à 11 (Makhloufi, 2006).

La composition du milieu, en particulier les sources et les concentrations de carbone affectent fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques productrices de bactériocines requièrent de nombreux nutriments pour leur croissance et des milieux riches contenant de l'extrait de viande, de levure et des hydrolysats de protéines sont nécessaires. Il a déjà

montré que l'augmentation des concentrations en extraits de levure, viande ou peptone peut permettre une augmentation de la production de bactériocines (Todorov et Gomez., 2004 ; Mataragas et *al.*, 2004).

1.3.6.3. Production des bactériocines

Les bactériocines sont produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance (Dortu et Thonart., 2009). Elles peuvent être dégradées par les protéases produites par les bactéries lactiques productrices (Savijoki et *al.*, 2006) ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture. Différentes protéines sont impliquées dans la production des bactériocines et sa régulation. Les bactériocines sont produites sous forme d'un pré peptide non-biologiquement actif qui subira des modifications post traductionnelles pour aboutir au peptide actif. Cette production est souvent régulée par un système de Quorum Sensing, un mécanisme permettant à certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité de la population bactérienne, L'expression de gènes localisés soit sur le chromosome, comme c'est le cas de la mersacidine(Altena et *al.*, 2000), soit sur un plasmide, comme c'est le cas de la sakacine A (Axelsson et Holck, 1995), ou sur un transposon, comme c'est le cas de la nisine (Rauch et De Vos, 1992a).

Les facteurs influençant la production de bactériocines sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée (Dortu, 2008).

1.3.6.4. Conditionnement des bactériocines

Il est très difficile de conditionner les bactériocines sous la forme purifiée. Les bactériocines semi-purifiées peuvent être conditionnées sous forme sèche par atomisation ou lyophilisation (Parente et Riccardi, 1999). La nisine, la seule bactériocine légalement approuvée comme additif est commercialisée sous forme semi-purifiée (Dortu et Thonart, 2009).

1.3.6.5. Bactériocines en agroalimentaire

La bioconservation des aliments fait l'objet depuis 40 ans de nombreuses études. Elle consiste en une augmentation de la durée de vie et une amélioration de la sécurité sanitaire des produits alimentaires, en utilisant des microorganismes et/ ou leurs métabolites (Ross et *al.*, 2002 ; Stiles, 1996). Les bactéries lactiques et/ ou leurs métabolites utilisés depuis des millénaires d'une façon empirique par de nombreuses populations, peuvent contribuer à la conservation des aliments (Ross et *al.*, 2002). C'est grâce aux propriétés antimicrobiennes de métabolites qu'ils synthétisent, tels que l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl (Atrih et Foster, 2001a), les composés

antifongiques (Corsetti *et al.*, 1998), les acides phényl-lactiques (Lavermicocca *et al.*, 2000), les antibiotiques comme la reutéricycline (Höltzelet *al.*, 2000) et les bactériocines, que les bactéries lactiques sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires (Abee *et al.*, 1995, Klaenhammer, 1988). Afin de diminuer l'utilisation des additifs chimiques dans l'alimentation et d'obtenir des aliments prêts à la consommation et respectant les règles de la sécurité sanitaire, l'industrie agroalimentaire s'intéresse à l'utilisation des bactériocines comme bio-conservateurs (Robertson *et al.*, 2004).

L'absence de toxicité pour les cellules eucaryotes et la perte d'activité en présence des protéases présentes dans le tube digestif présentent des propriétés qui pourraient placer les bactériocines parmi les substances sans danger pour l'Homme. Elles doivent cependant, pour le moment, être considérées comme un moyen de conservation complémentaire à ceux déjà existants (Deegan *et al.*, 2006).

Des bactériocines sont commercialisées sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation par la souche productrice et atomisation d'un substrat alimentaire tel que le lait, par exemple. Considéré comme un ingrédient fermenté, ce type de préparation contiendra d'autres métabolites microbiens tels que l'acide lactique (Dortu et Thonart, 2009)

1.3.6.6. Utilisation alimentaire des bactériocines

Les bactériocines sont employées dans plusieurs domaines. Leur utilisation dans le domaine alimentaire est devenue très intéressante grâce à leur potentiel d'assurer une sécurité microbienne et une bonne qualité du produit alimentaire (Delves-Broughton, 1990 ; Benech, *et al.*, 2002). L'utilisation des bactériocines comme additifs naturels dans les aliments a suscité l'intérêt du consommateur qui cherche à minimiser l'utilisation des additifs chimiques artificiels dans les produits alimentaires. Plusieurs études ont montré l'efficacité de la nisine en tant qu'agent de conservation dans les aliments comme la truite fumée (Nykanen *et al.*, 1999), les produits à base d'œufs liquides pasteurisés (Delves-Broughton *et al.* 1996), les fromages et d'autres produits laitiers (Delves-Broughton, 1990). En effet, la nisine est la plus étudiée des bactériocines et la seule utilisée commercialement dans les produits alimentaires.

Afin de s'assurer de l'efficacité des bactériocines utilisées pour des applications alimentaires en tant que préservateurs, un conservateur alimentaire doit avoir les propriétés suivantes (Dortu et Thonart, 2009) :

- Être actif sur les micro-organismes pathogènes aussi bien que sur ceux responsables des altérations des aliments ;

- Être inoffensif pour les humains ou les animaux ;
- Être stable et non détruit au contact de l'aliment ou du micro-organisme ;
- Être rapidement soluble et distribué uniformément dans l'aliment ;
- Ne pas être inactivé par l'aliment, ni conférer de saveur ou d'arôme à l'aliment ;
- Ne pas favoriser l'apparition de micro-organismes résistants
- Ne pas diminuer la valeur nutritive de l'aliment.

D'une façon générale, les conservateurs alimentaires entre autres les bactériocines inhibent les micro-organismes en interférant avec leur membrane cellulaire, leur activité enzymatique ou leur métabolisme génétique. Ainsi, ils peuvent dénaturer leur protéine, altérer ou détruire leur ADN, leur paroi cellulaire ou leur membrane cytoplasmique. Ainsi, par ces divers mécanismes d'action, ces additifs naturels peuvent améliorer largement la sécurité alimentaire des produits.

1.3.6.7. Applications médicales des bactériocines

L'émergence de la résistance aux antibiotiques conventionnels ces dernières années a orienté la recherche vers l'étude de nouveaux agents antimicrobiens. Le mode d'action des bactériocines qui diffèrent de ceux des antibiotiques conventionnels et l'innocuité des bactériocines permettraient leur utilisation comme alternative aux antibiotiques dans la prévention et/ ou le traitement des infections dues à des bactéries devenues résistantes aux traitements conventionnels (Dicks et *al.*, 2011). Contrairement aux applications alimentaires des bactériocines, aucune de bactériocine n'est à ce jour commercialisée comme médicament. Cependant, quelques-unes d'entre elles sont en cours d'essais cliniques pour le traitement d'infections cutanées, respiratoires, systémiques et/ ou urogénitales ainsi qu'en tant qu'agents contraceptifs parmi elles la rBPI21 en phase clinique III pour le traitement de la méningite (Hancock, 2000).

1.4. Les probiotiques

1.4.1 .Historique et développement du concept probiotique :

La définition du terme probiotique a évolué dans le temps en fonction de la réflexion des chercheurs, des connaissances scientifiques et des avancées technologiques.

Au XX siècle le lauréat du prix Nobel, Elie Metchnikoff a observé qu'un nombre surprenant de personnes en Bulgarie vivait plus de 100 ans. Cette longévité ne pouvait pas s'expliquer par les avancées de médecine moderne, car la Bulgarie, l'un des pays les plus pauvres d'Europe à l'époque, ne bénéficiait pas de telles avancées. Le Dr. Metchnikoff a constaté que les Bulgares consommaient de grandes quantités de yaourt, et il a associé l'augmentation de la longévité observée à la consommation des microorganismes vivants provenant des produits laitiers fermentés. Même si Metchnikoff voyait les microbes comme étant plutôt nuisible pour la santé humaine, il considérait bénéfique la substitution des bactéries du tractus gastro-intestinal par celle du yaourt dont le bacille bulgare. Il a alors expliqué l'effet bénéfique meilleur de ce dernier par l'absence de production d'alcool (néfaste à la longévité), en comparaison aux bactéries présentes dans d'autres laits fermentés tels que le kéfir ou le koumys. De plus il a supposé que l'acide lactique produit, ainsi que d'autres facteurs non identifiés, agiraient de façon synergique pour inhiber la croissance de bactéries de la putréfaction dans le colon (Guarner et *al.*, 2008).

A la même époque, en 1906, le pédiatre français Henry Tissier a observé que les selles des enfants souffrant de diarrhées contenaient un faible nombre de bifidobactéries par rapport aux selles d'enfants en bonne santé. Il suggéra alors d'administrer ces bactéries aux patients diarrhéiques pour les aider à restaurer un microbiote intestinal sain (FAO/WHO, 2001 ; Piquepaille, 2013).

Metchnikoff et Tissier sont donc les premiers à émettre l'idée d'administrer des microorganismes exogènes afin de pallier à un éventuel dysfonctionnement de notre écosystème intestinal. Le concept « probiotiques » est né.

Cependant, ce n'est qu'en 1954 que le terme de probiotiques a été introduit dans la littérature par Ferdinand Vergin, ce terme dérivé du grec « pro bios », qui signifie littéralement « en faveur de la vie » par opposition aux effets délétères des antibiotiques.

En 2002, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et la Food and Agriculture Organisation des Nations Unies(FAO) officialisaient la définition de terme probiotique afin d'éviter toute dérive. Les probiotiques sont donc définis comme « des organismes vivants qui, ingérés en quantité suffisante, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (FAO/WHO ,2002).

1.4.2. Définition

Le terme probiotique a bénéficié de plusieurs définitions qui ont évolué dans le temps en fonction des connaissances scientifiques et des avancées technologiques (Ait-Belgnaoui et *al.*, 2006). Finalement, c'est en 2002 que la FAO (Food and Agriculture Organization) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé ; WHO) ont formulé la définition suivante : « microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte qui les ingère ».

1.4.3. Principales espèces de bactéries lactiques à potentiel probiotique

Les espèces les plus fréquentes et les plus rapportées dans la littérature sont du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, mais il faut aussi mentionner des souches du genre *Enterococcus* et *Streptococcus* (Gbassi et *al.*, 2011 ; Rokka et Rantamaki, 2010).

Tableau 2: Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques (FAO/WHO, 2002)

Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none"> • Historique de non pathogénicité (GRAS) • Souche d'origine humaine ou alimentaire • Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques • Souche déposée dans une collection de culture internationale • Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques • Pas de deshydroxylation des sels biliaires
Critères fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> • Tolérance à l'acidité • Tolérance à la bile • Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes • Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou au mucus • Stimulation du système immunitaire
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini • Conservation des propriétés probiotiques après production

1.4.4. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques

Les probiotiques présentent des propriétés qui sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce de la souche utilisée car les effets probiotiques sont spécifiques à la souche microbienne. Il est nécessaire de caractériser de manière précise les souches utilisées. La détermination taxonomique d'une souche potentiellement probiotique est une étape indispensable.

Une série de principes généraux et de critères pratiques selon la FAO/WHO(2002) ont été mis en place pour sélectionner les souches probiotiques les plus sécuritaires. Ces dernières doivent être identifiées *via* des méthodes moléculaires fiables de détermination du phénotype et du génotype. Toutes les souches probiotiques doivent être déposées dans une collection de cultures reconnue à l'échelle internationale (à chaque souche est attribué un code alphanumérique d'identification choisi par le laboratoire ou la collection. Une fois identifiées, les bactéries probiotiques doivent être nommées selon les règles du Code International de Nomenclature des Bactéries pour une compréhension universelle (*Nom du genre / nom de l'espèce /identifiant de la souche*) (Vasiljevic et Shah, 2008 ; Butel, 2014).

La non-pathogénicité (innocuité) des souches est un critère très important, les souches ayant le statut GRAS (*Generally Regarded As Safe*) sont d'ailleurs à favoriser. Ce critère de sécurité semble évident, mais il est important de l'évaluer précisément pour chaque souche potentiellement probiotique, en étudiant tout effet indésirable possible (résistance aux antibiotiques, activités métaboliques nocives, production de toxines, potentiel infectieux, activité hémolytique) (Fitzpatrick, 2005 ; Rothe et Blaut., 2013).

Toutefois, le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques qui doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin, et donc résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte étant donné que les bactéries sont administrées par voie orale (Millette, 2008).

Ainsi, pour garantir leur survie pendant le passage du tractus digestif, les probiotiques sont premièrement criblés pour leur tolérance au pH acide et à la bile. L'adhésion des bactéries probiotiques aux tractus digestif leur permet de produire durablement des molécules bénéfiques pour l'hôte, mais permet également l'exclusion des pathogènes et une immuno-stimulation (Servin, 2004). Les microorganismes potentiellement probiotiques doivent donc être sélectionnés selon différents critères qui sont décrits dans le tableau 4.

Tableau 3: Critères de sélections utilisés aux laboratoires pour le screening des probiotiques (Nousiainen et al., 2004)

Critères	But recherché
Résistance à l'acidité	Survie pendant le passage par l'estomac et le duodénum
Résistance aux sels biliaires	Survie pendant le passage par l'intestin grêle
Production d'acide (à partir du glucose et de lactose)	Production « de barrière acide » efficace dans l'intestin
Adhésion au mucus et/ou aux cellules épithéliales humaines	Colonisation efficace, réduction des sites d'adhésion des pathogènes à la surface
Production de substances antimicrobiennes	Inhibition du développement des germes pathogènes
Résistance à la chaleur	Survie pendant le processus de transformation
Bonnes propriétés technologiques	Stabilité, croissance sur une large échelle, survie dans le produit, résistance aux bactériophages.

1.4.4.1. Résistance à l'acidité

Le comportement des bactéries dépend de la souche, par conséquent, il est nécessaire de connaître le genre et l'espèce des souches utilisées.

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer les pH bas. Le temps de passage peut-être d'une à trois heures selon l'individu et le régime. Par conséquent, des auteurs proposent que les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2,5 dans un milieu de cultures pendant quatre heures (Ammor et Mayo. 2007)

1.4.4.2. Résistance aux sels biliaires

Dans l'intestin grêle, la tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. Les bactéries qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum après ingestion d'un repas gras. Les bactéries peuvent réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant avec des hydrolases et de fait diminuent leur solubilité (Gu et al., 2008).

1.4.4.3. Adhésion aux cellules intestinales

La capacité d'adhésion à la couche est un critère incontournable de sélection recommandé pour le choix des probiotiques. L'adhérence constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes. Elle est basée sur la réalisation d'un ensemble de tests in vitro

puis *in vivo* en utilisant des cellules d'origine humaine et/ou animale (Palomares et *al.*, 2007 ; Reyes-Gavilan et *al.*, 2011).

En plus du pouvoir d'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin, les probiotiques peuvent se fixer au mucus qui recouvre les entérocytes ou aux divers microorganismes que l'on retrouve dans le tractus gastro-intestinal (Lamoureux, 2000).

1.4.4.4. Production de substances antimicrobiennes

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/ bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (Titek et *al.*, 1996 ; Labioui et *al.*, 2005).

1.4.4.5. Résistance aux antibiotiques

Les bactéries lactiques sont naturellement résistantes à beaucoup d'antibiotiques grâce à leur structure et physiologie. Les travaux de Temmerman et *al.* (2003) ont montré que 68.4% des probiotiques isolés ont une résistance à un antibiotique ou plus. En effet, des souches de *Lactobacillus* ont été trouvées résistantes à la kanamycine (81%), à la tétracycline (29.5%), à l'érythromycine (12%) et au chloramphénicol (8.5%). 38% des isolats de *Enterococcus faecium* ont été trouvés résistants à la vanomycine.

Dans la plupart des cas la résistance n'est pas transmissible, cependant, il est possible que le plasmide codant pour la résistance aux antibiotiques soit transféré à d'autre espèces et genre. C'est une raison significative pour choisir des souches manquantes du potentiel de transfert de résistance (Denohue, 2004).

Les autorités européennes ont récemment conclu que quelques bactéries utilisées pour la production d'aliment pourraient poser un risque à la santé humaine et animale en raison d'héberger des souches avec les gènes de résistance transmissibles. Par conséquent, avant de lancer une culture probiotique, il est important de vérifier que les souches bactériennes impliquées ne comportent pas de gènes transmissibles de résistance aux antibiotiques (Ammor et *al.*, 2007).

1.4.5. Mécanisme d'action

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de véhiculer les principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, substances antimicrobiennes) jusqu'à leurs cibles d'actions dans le tractus digestif.

Les mécanismes d'action des probiotiques sur l'hôte sont complexes, souvent multiples et dépendent de la souche bactérienne considérée ; ils agissent en particulier en inhibant les bactéries indésirables, en neutralisant les produits toxiques, en améliorant la digestibilité alimentaire et en stimulant l'immunité, ceci suggère qu'il faut un contact direct de ces probiotiques avec les différents constituants de la barrière intestinale, tels que la microflore endogène, le mucus intestinal, les cellules épithéliales. Ils sont également une source de vitamines (essentiellement du groupe B), et de sels minéraux assimilables (Robin et Rouchy, 2001 ; Ait-Belgnaoui et *al.*, 2005).

1.4.6. Critères technologiques

En plus de l'innocuité et des propriétés fonctionnelles, des critères technologiques sont également pris en considération dans la sélection des souches probiotiques. Selon Saarela et *al.* (2000), ces critères sont :

- Bonnes propriétés sensorielles
- Résistance aux phages
- Viabilité durant le traitement technologique
- Stabilité du produit durant le stockage

1.4.7. Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé

De nos jours, les probiotiques font l'objet de recherches intensives et on trouve de plus en plus de preuves démontrant la variabilité des effets bénéfiques associés à la consommation de probiotiques.

Ces effets peuvent être répartis en deux groupes : des effets bénéfiques sur l'équilibre de la microflore intestinale et des effets thérapeutiques. La figure 15 illustre la diversité des effets bénéfiques sur la santé.

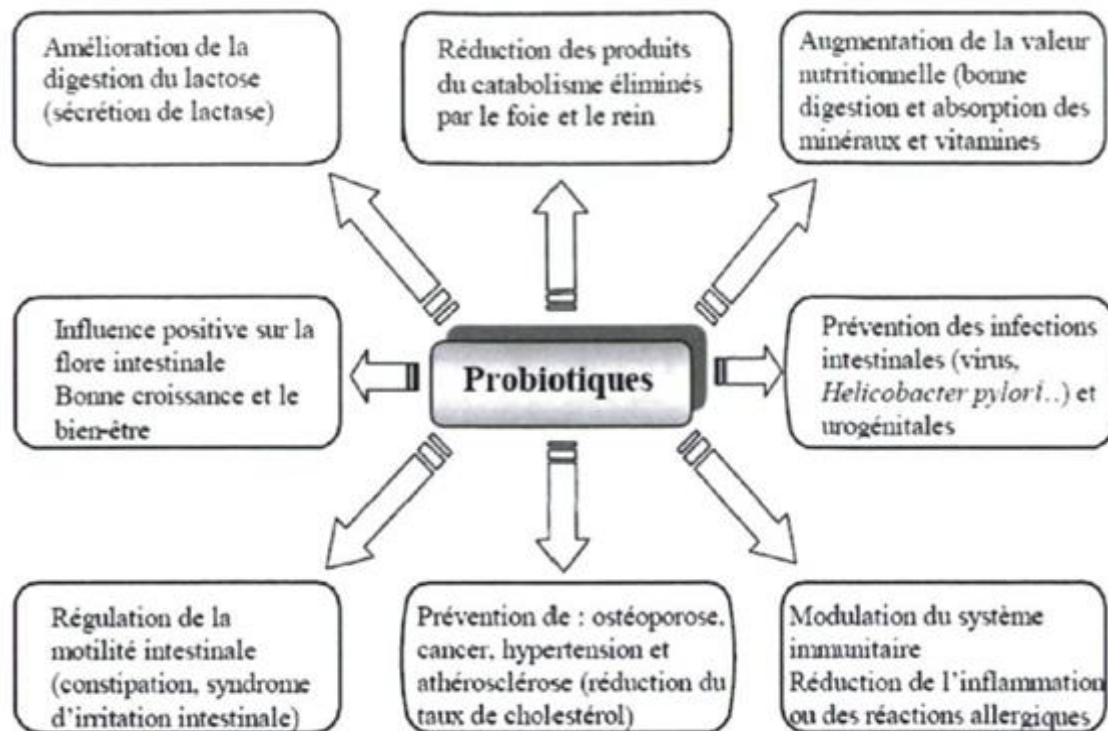


Figure 15 : Les principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques ((Mercenier et al., 2003).

1.4.8. Applications des probiotiques

Les différents produits commercialisés en tant que probiotiques humains ou animaux sont constitués soit d'un seul microorganisme (produits dits monosouches) ou d'une association de plusieurs espèces (produits dits pluri-souches). De nos jours, les produits probiotiques sont commercialisés sous trois formes (Patterson, 2008) :

- Un concentré de culture ajouté à des aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales ;
- Un ingrédient ajouté à un aliment à base de lait ou de soja et auquel on permet d'atteindre une concentration élevée par fermentation ;
- Des cellules séchées, concentrées, en poudre, en capsule ou en comprimés.

Les probiotiques sont généralement associés aux produits laitiers de culture. La gamme de produits probiotiques comprend maintenant des fromages, des crèmes glacées et des yogourts glacés de même que des aliments et des boissons non laitiers (Patterson, 2008).

La survie des probiotiques dans les produits est affectée par plusieurs facteurs au cours des processus de transformation et de stockage. Les nouvelles technologies, comme la micro-

encapsulation et la technologie des cellules immobilisées, offrent une protection additionnelle aux organismes probiotiques et de nouvelles façons d'inclure des probiotiques dans les produits alimentaires. Les fabricants commercialisent de nouveaux vecteurs d'administration de probiotiques comme des pailles et des capsules de bouteille qui, lorsque percées ou brisées, délivrent des doses thérapeutiques de probiotiques dans un produit alimentaire (Kailasapathy, 2002 ; Patterson, 2008).

1.5. Les interactions

1.5.1. Définition

L'évolution des conditions physico-chimiques et la disponibilité en nutriments sont des éléments importants pour le développement des micro-organismes. Ils peuvent ainsi générer des phénomènes d'interactions. Ces interactions sont classées selon une approche phénoménologique basée sur leurs effets positifs ou négatifs et ou une approche mécanistique c'est-à-dire directe (contact physique entre les bactéries) ou indirecte (substance produite ou consommée par un des microorganismes).

Ces interactions peuvent s'établir entre différentes populations (moisissures, bactéries), et au sein même d'une population regroupant différentes espèces ainsi qu'entre différentes souches d'une même espèce. Lorsqu'un phénomène d'interaction se déroule entre deux ou plusieurs microorganismes, les cinétiques de croissance et de production, ainsi que les caractéristiques finales des produits peuvent être modifiées. Ainsi, tout au long du processus de fabrication, on observe une dynamique au sein des populations. Certains micro-organismes se multiplient activement, alors que d'autres tendent à disparaître (Nissen *et al.*, 2003).

Les bactéries lactiques sont très souvent associées, soit entre elles, soient avec d'autres microorganismes (moisissures, levures, bactéries non lactiques) formant des cultures mixtes où différents types d'interactions peuvent se produire. L'ensemble de ces interactions gouverne la structure des communautés microbiennes et leurs activités (Nissen *et al.*, 2003).

Ces interactions sont généralement classées en deux catégories : interactions directes et indirectes. Les interactions directes impliquent un contact physique entre deux populations. Il s'agit des interactions de prédation, parasitisme et inhibition par contact direct entre microorganismes (cell-cell contact mechanism). Les interactions indirectes sont dues à des métabolites extracellulaires et comprennent le mutualisme, le commensalisme, l'amensalisme et la compétition.

Ces interactions sont classées selon une approche phénoménologique basée sur leurs effets positifs, se caractérisant par la stimulation d'un ou de plusieurs microorganismes ou négatifs correspondant à l'inhibition de la croissance et de l'activité métabolique (Cholet, 2006 ; Monnet *et al.*, 2008) ; et une approche mécanistique c'est-à-dire directe (contact physique entre les bactéries) ou indirecte (substance produite ou consommée par un des microorganismes).

1.5.2. Différents types d'interactions

1.5.2.1. Interactions positives : Synergie

Ces interactions sont aussi appelées interactions de coopération car elles surviennent lorsqu'il y a stimulation d'une espèce bactérienne suite à la production ou à la libération de métabolites particuliers dans le milieu (acide lactique, arômes, disponibilités de composés azotés, etc.)(Bullard, 2011) .Ce type d'interaction peut être observé lorsque la croissance d'une première espèce apporte des modifications au milieu (changement de pH, éliminations de facteurs inhibiteurs, etc.), le rendant ainsi favorable à la croissance d'une deuxième espèce (Juillard et *al.*, 1987). Un bon exemple de ce type d'interaction est illustré chez les souches (*S. thermophilus* et *Lb. Bulgaricus*) utilisées pour la production de yogourt.

Ces interactions de coopération regroupent les interactions de type commensalisme, mutualisme et protocoopération.

➤ **Commensalisme**

Il s'agit d'interaction où l'un des microorganismes en jeu est stimulé par la production d'une substance ou par la destruction d'un facteur inhibiteur.

➤ **Mutualisme et protocoopération**

Dans le mutualisme, la présence de chaque micro-organisme est indispensable pour la survie de l'autre alors que dans la protocoopération l'interaction n'est pas nécessaire à la survie des populations mais la présence des deux microorganismes ensemble entraîne une amélioration de leur développement (Nehem, 2008).

1.5.2.2. Les interactions négatives : Inhibition

Les interactions négatives faisant intervenir la production de substances inhibitrices notamment le cas des acides organiques issus des mécanismes homofermentaires et hétérofermentaires des bactéries lactiques. L'inhibition peut aussi résulter de la production de substance, de peroxyde d'hydrogène, les bactériocines produites par quelques souches de bactéries lactiques sont également des agents inhibiteurs très puissants (Gilliland, 1985).Ce type d'interactions inclue la compétition, l'amensalisme, la prédation et le parasitisme.

➤ **La compétition**

C'est une interaction inhérente à la conquête des niches écologiques. Il peut s'agir de plusieurs espèces consommant le même substrat (carbone, oxygène...) ou de la distribution spatiale dans un écosystème (biofilm). Dans ce type d'interaction les mécanismes d'inhibition sont réciproques. Cette compétition peut s'exercer vis-à-vis de l'espace disponible (inhibition de contact) et /ou de la disponibilité en substrat (Cholet, 2006)

➤ **L'amensalisme**

L'amensalisme est une interaction inter-espèces où la présence d'un ou de plusieurs micro-organismes a un effet inhibiteur sur le développement d'autres micro-organismes présents dans le même environnement, sans que le micro-organisme inhibiteur en tire le moindre profit. Certains métabolites tels que les acides carboxyliques, le lactate, le peroxyde d'hydrogène ou encore les bactériocines participent à ce phénomène (Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Van de Guchte et al, 2001 ; Sieuwerts et al, 2008). Les effets inhibiteurs agissent sur la croissance des micro-organismes pathogènes, indigènes ou inoculés (Sieuwerts et al, 2008).

➤ **Prédation et parasitisme**

Pour ces deux types d'interactions, une espèce vit au dépend d'une autre espèce pour son propre bénéfice ou la détruit pour s'en nourrir.

1.6. Identification des bactéries par MALDI-TOF MS

L'identification des bactéries, isolées à partir de prélèvements biologiques, pendant des années, a été basée uniquement sur des critères morphologiques et biochimiques. Le développement des techniques de biologie moléculaire à partir des années 1990 a permis d'introduire ces approches au sein des laboratoires d'analyse biologique. Leur intérêt dans l'identification des bactéries s'est accru au fil des années. Elles permettent d'obtenir un résultat en quelques heures dans les situations d'urgence (identification et typage du germe, et détection des résistances antibiotiques) ou d'identifier un microorganisme si les systèmes utilisés en routine (approche biochimique) sont pris en défaut. De plus, dans les prélèvements biologiques, elles rendent possible la caractérisation des bactéries si la culture est restée négative, si les bactéries recherchées sont des bactéries intercellulaires strictes (pour lesquelles la culture est réservée à des laboratoires spécialisés) ou des bactéries encore incultivables à ce jour (Cariello, 2012).

1.6.1. Le spectromètre de masse MALDI-TOF MS

Les premières études de l'identification des microorganismes par la méthode d'analyse MALDI-TOF (Matrix – Assisted Laser Desorption and Ionisation, Time- Of Flight Mass Spectrometry) ont débuté dans les années 1990 (figure 16).

L'avènement de systèmes informatiques plus performants et la constitution de base de données ont permis la commercialisation en 2008 des premiers systèmes d'identification de routine aux laboratoires d'analyses médicales (Hemmersbach ,2008).

Si les techniques conventionnelles d'identification des différents germes se basent sur leurs aspects phénotypiques, il est possible aujourd'hui d'identifier les microorganismes en analysant directement leurs protéines par le MALDI-TOF MS (Cariello, 2012).

1.6.2. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge. Les applications de la spectrométrie de masse sont nombreuses et touchent divers domaines : en biotechnologies pour l'analyse des peptides ou oligonucléotides, en pharmacologie pour le dosage de médicaments, dans le domaine de l'environnement pour l'analyse de l'eau, en clinique pour la recherche de drogues.

➤ MALDI-MS

L'analyte est d'abord co-cristallisé à des petits composés organiques (matrice) pour le protéger d'un contact direct avec le faisceau ionisant et éviter sa dégradation. Ceux-ci vont absorber la radiation du laser UV et transférer l'énergie aux protéines qui s'ionisent positivement. Les ions générés vont se libérer des protéines. Les molécules chargées (+1) sont alors accélérées dans un champ électrique.

➤ TOF

Après leur passage dans le champ électrique, les ions entrent dans un tube non soumis à un champ électrique et sont séparés selon leur masse-charge. Les ions prennent des vitesses différentes car les grosses molécules se déplacent plus lentement que les petites. Ensuite, un analyseur de temps de vol va détecter le passage de chaque ion et créer les pics sur le spectre qui par après est comparé à une base de données. Certains composants du spectre sont spécifiques à un genre, d'autres à une espèce voire une sous-espèce. Selon la qualité et la pureté de l'échantillon et le nombre de spectres de référence dans la base de données, l'identification de la bactérie se fait en quelques secondes à quelques minutes.

➤ La matrice

La matrice est constituée de molécules cristallisées dont les plus utilisées sont l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque (DHB), l'acide sinapinique et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) (Cariello, 2012). Ces molécules sont ajoutées à un solvant (acétonitrile, éthanol ou acide trifluoroacétique). Le DHB convient pour l'analyse des échantillons organiques hydrophobes ou des polymères aromatiques, tandis que l'acide sinapinique et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique sont destinés pour l'analyse des protéines.



Figure 16 : Spectromètre de masse BrukerDaltonics Germany et son unité informatique (BrukerDaltonics, Germany).

II- MATERIEL & METHODES

2. MATERIEL ET METHODES

L'intégralité du travail a été réalisée au Laboratoire des Sciences et Technique de Production Animale(LSTPA) de l'université Abdelhamid Ben Badis de Mostaganem. Les analyses des isolats par MALDI-TOF MS ont été effectuées au Centre de Recherche scientifique et technique en Analyse Physico-Chimiques (CRAPC).

2.1. Origine et échantillonnage du blé fermenté :

Les prélèvements, du blé fermenté nommé en Algérie « hamoum », proviennent d'un silo souterrain traditionnel de la localité de Mazouna wilaya de Relizane.

Les grains de blé prélevé pèsent chacun environ 35 à 45mg et datent d'une année. Ils sont récupérés dans un bocal stérile et mit à 4°C jusqu'à utilisation. Ces grains sont de couleur gris-jaunâtre ayant une forte odeur de fermentation à cause de leur long séjour dans le silo.

2.2 .Milieux de culture et conditions de croissance

Les milieux de cultures utilisés sont sous forme liquide ou solide après l'ajout de 15g/l d'agar agar. Les milieux sont les suivants :

- Le milieu MRS (De Man et *al.*, 1960)
- Le milieu M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)
- Le milieu MSE (Mayeux et *al.*, 1962)
- Des milieux ont été utilisés pour l'identification phénotypique des isolats lactiques comme le bouillon de Möeller à arginine, le bouillon hypersalé, lait de Sherman à 0.1% et 0.3% de bleu de méthylène.

Tous les milieux de culture utilisés dans cette étude sont stérilisés à 120°C pendant 20mn.La composition des différents milieux de cultures est présentée en annexe I.

2.3. Isolement des bactéries lactiques

Trois grains de blé fermenté « Hamoum » sont mis dans 9ml d'eau physiologique stérile et incubés à 30°C pendant 24h.A partir de cette culture mère, une série de dilution décimale (jusqu'à 10⁻⁶) est réalisée, où 1ml de chaque culture mère est ajouté à 9ml de MRS ou M17. Chacun des 2 milieux est additionné de cycloheximide à une concentration de 200mg/l de milieu pour éliminer la flore fongique et les levures. Après homogénéisation, un volume de 0.1ml de chaque dilution est étalé en surface dans des boîtes de Pétri contenant les milieux MRS ou M17solides.

Trois boîtes de Pétri par dilutions et par milieu de culture sontensemencées et incubées à 30°C et 37°C durant 24 à 48h. Après croissance sur ces milieux, les boîtes dont les colonies sont bien distinctes et dont les caractères cultureux comme l'aspect, la taille et la couleur, correspondent aux caractéristiques des bactéries lactiques sont isolées en vue d'une purification.

2.4. Purification et pré-identification des isolats et leur appartenance au groupe lactique

La réalisation de la purification sur les bactéries sélectionnées est réalisée par un repiquage (trois fois) successivement sur les milieux MRS et M17 selon la méthode d'épuisement de charge (méthode de quadrants). Après 24 à 72h d'incubation à 30°C, les colonies, bien distinctes et bien développées, sont retenues pour des examens macroscopiques, microscopiques et une recherche de la catalase afin de confirmer leur appartenance au groupe lactique.

➤ Examen macroscopique et microscopique :

Sur boîtes de Pétri et à l'aide d'une loupe binoculaire, les colonies isolées sont soumises à une observation macroscopique afin de déterminer les caractères cultureux (forme, aspect, taille, couleur, opacité et contour). Ensuite, l'observation microscopique par coloration différentielle nous permet de distinguer les isolats selon le type de Gram (positif ou négatif), leur morphologie (bacille ou coque) et leurs modes d'associations (isolés, en chaînettes ou en tétrades). Les bactéries lactiques sont à Gram+.

➤ Recherche de la catalase :

La catalase est une enzyme qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée (H₂O₂) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante :



La mise en évidence de cette enzyme est réalisée sur une colonie bactérienne mise en présence d'eau oxygénée à 10 V. L'apparition de l'effervescence traduit la présence d'une activité catalasique. Les bactéries lactiques sont catalase négatives (Larpent, 1997).

Seules les bactéries Gram positives et catalase négatives sont retenues et conservées pour une caractérisation phénotypique.

2.5. Conservations des bactéries lactiques

Après purification, les isolats sont conservés selon deux méthodes :

➤ Conservation de courte durée : les isolats purs sontensemencés dans des tubes de MRS incliné. Après incubation à 37°C, les tubes sont placés à +4°C durant plusieurs semaines.

➤ Conservation de longue durée : les isolats bactériens purs sont cultivés dans du lait écrémé stérile à 70% (enrichi par 0.05% d'extrait de levure) supplémenté de 30% à 40% de glycérol (Samelis et *al.*, 1994). Les cultures sont incubées à 30°C et dès la coagulation du lait, elles sont conservées à -20°C.

2.6. Souches pathogènes utilisées

Nous avons utilisé des souches pathogènes à Gram positif et négatif comme bactéries indicatrices pour l'étude de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques. Trois souches bactériennes sont des souches de références ATCC provenant de l'institut Pasteur. Le tableau 6 indique le genre, l'espèce et le code de ces bactéries.

2.6.1. Vérification de la pureté et de l'identité des souches pathogènes

La purification des bactéries pathogènes a été effectuée par ensemencement en stries sur les milieux sélectifs pour chacune des bactéries pathogènes. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h.

Les milieux de culture sélectifs utilisés pour la purification des bactéries pathogènes sont indiqués dans le tableau 5.

Tableau 4: Milieux sélectifs des souches pathogènes

Souches	Milieux sélectifs
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chapman
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	King B
<i>Escherichia coli</i>	VRBL - Mac Conkey

Tableau 5: Souches pathogènes

Genre et espèces	Code	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Institut Pasteur
<i>Pseudomonas laeruginosa</i>	ATCC 27853	Institut Pasteur
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25921	Institut Pasteur

2.7. Dénombrement des bactéries lactiques

Pour dénombrer la flore lactique présente dans notre échantillon, on utilise les milieux MRS et M17 où 0.5ml de chaque dilution de la solution mère sont ensemencés en masse. Ensuite les boîtes sont incubées à 30°C pendant 72h. Deux dilutions (10^{-5} et 10^{-6}) ont été retenues pour le comptage des colonies qui est exprimé en UFC (unités formant colonies) par gramme d'échantillons selon la formule suivante Guiraud(1998).

$$N = \frac{\sum c}{V_{ml} (n_1 + 0,1n_2) \times d_1}$$

- N : nombre de microorganismes présents dans l'unité de mesure de l'échantillon
- c : nombre total de colonies comptées sur une boîte retenue des dilutions effectuées ;
- V_{ml} : volume de l'inoculum appliquée à chaque boîte en ml ;
- n_1 : nombre de boîtes comptées à la dilution retenue la plus faible ;
- n_2 : nombre de boîtes comptées à la seconde dilution retenue ;
- d_1 : facteur de la première dilution retenue.

2.8. Pré-identification phénotypique des bactéries lactiques

L'identification des isolats lactiques a été établie par l'étude de différents tests clés préconisés par les auteurs cités ci-dessus. Cette caractérisation a été réalisée sur des colonies jeunes de (18-24h) et s'est effectuée en deux étapes. Tout d'abord, des tests physiologiques comme la croissance à différentes températures, à différentes concentrations de NaCl, à un pH alcalin et la thermorésistance et des tests biochimiques comme la croissance sur lait de Sherman, l'hydrolyse de l'arginine, de l'esculine, la production de l'acétoïne, d'EPS, le test de l'oxydase, la recherche du type fermentaire et la fermentation des carbohydrates. Ces tests ont nécessité l'utilisation de milieux spécifiques. La lecture est appréciée par la présence d'un trouble, dû à la croissance, dans le milieu liquide.

2.8.1. Caractérisation biochimique des isolats lactiques

2.8.1.1. Recherche de l'oxydase

Ce test est un critère d'identification des bactéries lactiques. A l'aide d'une pipette Pasteur, une colonie bactérienne est déposée sur un disque pré-imprégné du réactif N-diméthylparaphénylène diamine. Après une minute, les bactéries produisant l'oxydase deviennent violettes (Guiraud, 1998). Les bactéries oxydases négatives sont retenues.

2.8.1.2. Hydrolyse de l'esculine

Ce test permet de caractériser les bactéries capables d'hydrolyser l'esculine. L'esculine est un hétéroside qui peut-être dégradé par l'esculinase libérant ainsi du glucose et de l'esculétine. L'activité enzymatique est recherchée sur milieu gélosé à la bile esculine fourni par l'institut Pasteur (Algérie) (Devoyod et Poullain, 1988 ; Larpent-Gourgaud et *al.*, 1997). Après incubation à 30°C pendant 2 à 4 jours, l'hydrolyse de l'esculine se traduit par un noircissement du milieu dû à la liaison des sels ferriques solubles à l'esculétine.

2.8.1.3. Production des exopolysaccharides

La production de dextrane à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962). Les isolatsensemencés par stries et incubés à 30°C pendant 24h. Après incubation, les isolats producteurs de dextrane sont visualisés par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes. Ce test permet de différencier les bactéries productrices de dextrane et non productrices.

2.8.1.4. Production d'acétoïne

Elle est détectée par la réaction de Voges-Proskauer (VP) dont le principe est que l'acétoïne se transforme en diacétyle sous l'action de la soude en présence d'oxygène (Harrigan et Mc Cane, 1976). Celui-ci s'associe avec l' α -naphthol en formant un complexe rose détectable. Pour réaliser ce test, Onensemence 1% d'une culture overnight dans 10ml de lait à 0% de matière grasse stérile reconstitué à 11% de matière sèche. Onincube 24 à 48h à 30°C. Après coagulation et ajout de 3 à 4 gouttes de VPI-II, les tubes sont agités à la température ambiante pendant 15mn. La réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu.

2.8.1.5. Croissance sur lait bleu de Sherman

Ce test permet de mettre en évidence le développement des bactéries lactiques en présence du bleu de méthylène et de différencier entre les genres *Streptococcus* et *Lactococcus*. Les espèces de lactocoques utilisent l'oxygène présent dans le bleu de méthylène donnant ainsi une couleur blanche au milieu (Devriese et Pot, 1995).

Ce test concerne les isolats de forme cocci et indique leur capacité à pousser en présence de bleu de méthylène (BM) dont la coloration est bleue en conditions oxydantes et incolore en milieu réduit. La décoloration du BM est d'autant plus rapide que le nombre de bactéries est élevé (Delarras, 2007). Les isolats purifiés sontensemencés dans 2 séries de tubes contenant chacun 9ml de lait écrémé stérilisé et additionné d'1ml de BM à 0.1% et 0.3% (Guiraud, 1998).Après

incubation à 30°C pendant 48h, on note les observations relatives à la réduction du BM et à la coagulation du lait.

2.8.1.6. Recherche de l'Arginine dihydrolase (ADH).

Cette propriété est détectée en utilisant le bouillon de Möeller (Möeller, 1955), de bases exemptes d'arginine et un autre additionné d'arginine à 1%. Une colonie fraîche est ensemencée dans chacun des tubes. Les tubes sont recouverts d'huile de paraffine stérile. Après 24 à 48h d'incubation à 30°C, les bactéries qui utilisent le lactose acidifient le milieu qui prend une coloration jaunâtre alors que celles qui utilisent l'arginine ré-alcalinisent le milieu en libérant l'ammoniaque ce qui va permettre un retour à la coloration violette initiale. (Larpent, 1997).

2.8.1.7. Type fermentaire

Les bactéries lactiques pendant leur croissance dégradent les sucres contenus dans le milieu de culture en empruntant soit la voie homofermentaire dont le produit final est essentiellement l'acide lactique ou hétérofermentaires qui produit en plus de l'acide lactique, de l'éthanol, de l'acétate et du CO₂ (De Roissart et Luquet, 1994). Les bactéries homofermentaires (*Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus*) ne produisent pas de gaz contrairement aux bactéries hétérofermentaires (*Leuconostoc* et le groupe *Betabacterium* du genre *Lactobacillus*) qui produisent du CO₂ dans le milieu.

Des cultures jeunes sont cultivées dans des tubes contenant du MRS contenant des cloches de Durham et incubées à 30°C pendant 24h à 48h. La production de gaz (CO₂) se traduit par l'apparition de bulles dans la cloche.

2.8.1.8. Profil fermentaire des sucres.

Les bactéries lactiques possèdent la capacité de dégrader différentes sources de carbone constituant ainsi un critère indispensable pour leurs identifications.

L'étude de la fermentation des sucres est réalisée en bouillon MRS liquide préparé sans glucose, contenant du pourpre de bromocrésol (BCP) (0.04g/l) comme indicateur de pH et additionné de chaque sucre à tester. Après ensemencement des tubes, une fine couche de paraffine stérile est ajoutée pour assurer les conditions d'anaérobiose (Samelis et al., 1994). L'utilisation du sucre et la production d'acide se traduisent par le virage au jaune de l'indicateur de pH. Pour l'identification des isolats, les sucres utilisés à une concentration de 1% sont les suivants : maltose, glucose, raffinose, mannose, xylose, arabinose, fructose, galactose, lactose, glycérol, saccharose, rhamnose, tréhalose, cellobiose.

Un tube sans ajout de sucre ensemencé par l'isolat à tester a été utilisé comme témoin.

2.8.2. Caractérisation physiologique des isolats lactiques

2.8.2.1. Croissance à pH 9.6

Ce test permet de différencier entre les genres *Lactococcus* et *Enterococcus*. En effet, les espèces de lactocoques ne poussent pas à ce pH. Il est réalisé sur les cultures bactériennes dans du bouillon MRS ajusté à pH 9.6 à l'aide d'une solution de NaOH (N/9) et incubé à 30°C pendant 24h à 48h. La croissance bactérienne est appréciée par un trouble dans les tubes et par comparaison avec une culture réalisée dans du MRS à pH6, 5. (Carr et al, 2002).

2.8.2.2. Croissance à différentes concentrations de NaCl

Ce test permet de savoir si les bactéries sont capables de croître dans un milieu hypersalé, ce qui permet de distinguer les entérocoques des lactocoques. En effet, les espèces d'entérocoques poussent dans ce milieu. Les cultures sont ensemencées dans un bouillon MRS à 2%, 4%,5%, 6,5% et 7% de NaCl. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24 à 72 h. La capacité à croître dans ces milieux hostiles est appréciée par une croissance dans les milieux de culture et par comparaison avec un tube témoin réalisé avec une culture dans du MRS sans NaCl.

2.8.2.3. Croissance à différentes températures

Ce test permet de différencier les bactéries mésophiles des thermophiles (Leveau et al, 1991). Après inoculation des cultures isolées et purifiées dans du bouillon MRS, les tubes sont incubés aux températures de 10°C, 15°C, 30°C, 37°C et 45°C pendant 24h à 72h. La croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble. Un tube témoin non ensemencé est incubé pour chacune des températures (Guiraud, 1998).

2.8.2.4. Test de la thermorésistance

Ce test permet de connaître si les bactéries lactiques isolées ont la capacité de résister à un traitement thermique (Teuber, 1994). Des cultures pures sont inoculées dans du bouillon MRS et exposées à une température de 60°C pendant 30min puis incubées à 30°C pendant 24 à 48h. Les bactéries présentant une croissance sont considérées comme thermorésistantes (Stiles et Holzapfel, 1997).

2.9. Eude du pouvoir acidifiant

La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH de différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser l'acidité titrable par la soude

(NaOH, N/9) en présence d'un indicateur coloré de pH la phénolphtaléine (Larpent, 1997). L'acidité titrable mesurée est assimilée à des degrés Dornic (°Dornic) où 1°Dornic équivaut à 0.1g d'acide lactique/l de lait.

Pour réaliser ce test, les souches ont étéensemencées à raison de 1% dans des tubes contenant 10ml de lait écrémé stérile reconstitué à 12%. Après agitation, les mesures sont prises à intervalles de temps 0h, 2h, 4h, 6h et 24h d'incubation à 30°C. L'acidité est déterminée par la formule : **Acidité (°D) = $V_{NaOH} \times 10$**

V_{NaOH} : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans 10ml de lait.

2.10. Identification protéomique des isolats par MALDI-TOF SM

L'identification des isolats lactiques a été réalisée par la spectrométrie de masse de type Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation- Time- Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS).

Le principe général est basé sur l'étude du déplacement d'entités ioniques dans des champs électromagnétiques, ce qui permet l'identification des bactéries grâce à l'analyse de leur contenu protéique (Claydon et *al.*, 1996). L'ionisation est essentielle et est réalisée grâce à une matrice.

2.10.1. Préparation des isolats pour l'analyse protéomique

Les isolats sont soumis à une série de purification sur milieu PCA gélosé. A l'aide d'un cure-dent stérile, on récupère 3 à 4 colonies à identifier que l'on dépose sur la plaque cible du MALDI-TOF. Elles sont recouvertes de 10µl d'une solution saturée d'acide α -cyano-4-hydroxyciannique (HCCA, Matrix, BrukerDaltonics) à laquelle on ajoute 1µl d'acide formique. La plaque est mise à sécher à la température ambiante ensuite elle est introduite dans le spectrophotomètre de masse et les spectres sont obtenus (Nacef et *al.*, 2016).

2.10.2. Analyse des spectres obtenus

L'analyse protéomique est réalisée en utilisant une masse Microflex L20 spectromètre (Bruker Daltonics, Germany) équipée d'un laser N2 et d'un intervalle de masse entre 2.000-20.000Da. Sous l'effet de la pulvérisation du laser, les protéines de la cellule bactérienne vont se disperser et vont être piégées par la matrice, cela va donner une empreinte protéomique. Les spectres de masse MALDI-TOF enregistrés, sont analysés avec le logiciel MALDI-Bio Typer 4.0 (MALDI Biotyper4.0 Data base Bruker Daltonics, Germany). L'appareil est calibré avec la souche d'*E. coli* DH5 alpha, utilisée comme souche standard. Les résultats s'affichent avec un code couleur

et sont exprimés par score de correspondance MALDI-Biotyper allant de 0.000 à 3.000 qui indiquent le degré de confiance à accorder à l'identification (Lartigue et *al.*, 2009 ; Cherkaoui et *al.*, 2010) tableau 14 . Enfin les spectres obtenus à partir de nos isolats bactériens sont comparés aux spectres de référence présents dans la banque de données Biotyper).

Tableau 6: Score de concordance des spectres obtenus à partir d'une bactérie d'intérêt avec ceux de la base de données Biotyper, reflétant le degré de confiance à accorder à l'identification

Score	Description	Symbole	Couleur
2,300 - 3,000	Forte probabilité d'identification à l'espèce	+++	Verte
2,000 – 2,299	Identification du genre sécurisée, identification à l'espèce probable	++	Verte
1,700 – 1,999	Identification au genre probable	+	Jaune
0,000 – 1,699	Degré de confiance insuffisant pour l'identification	-	Rouge

2.11. Mise en évidence des interactions négatives

L'un des critères de sélection des probiotiques destinés à l'homme (FAO/OMS, 2002) est leur capacité à produire des substances antimicrobiennes et d'inactiver les bactéries pathogènes et/ou d'altération. Dans ce contexte, les interactions négatives qui correspondent à une inhibition de la croissance bactérienne et de l'activité métabolique ont été étudiées en utilisant deux méthodes.

- La méthode de Fleming et *al.*, 1975
- La méthode de Barefoot et Klaenhammer 1983

2.1.1. Inhibitions en milieu solide

La réalisation de la mise en évidence des inhibitions en milieu solide a été effectuée en testant dans un premier temps, l'effet des bactéries lactiques sur d'autres bactéries lactiques et sur des bactéries pathogènes dans un second temps.

2.1.2. Inhibitions entre bactéries lactiques

Pour déterminer les souches inhibitrices (productrices de substances inhibitrices) et les souches indicatrices (sensibles aux substances inhibitrices), nous avons testé les deux méthodes précitées pour l'ensemble de nos isolats.

2.11.2.1. Méthode de Fleming et *al.*(1975)

Cette méthode permet de mettre en évidence les inhibitions par contact cellulaire, on procède comme suit :

- Des cultures jeunes de 18h d'isolats lactiques à tester (supposés être inhibitrices) sont ensemencées en touches sur milieu MRS solide puis incubés à 30°C pendant 24 h.
- Ensuite, les isolats indicateurs (supposés être sensibles) sont ensemencés en masse. Un volume de 0.7ml de la culture indicatrice est rajouté à 8ml de gélose molle en surfusion (45°C). Le mélange est ensuite versé à la surface des boîtes pré-incubées conformément à la méthode de la double couche.
- Après solidification du milieu, les boîtes de Pétri sont mises à 30°C pendant 24h.
- L'inhibition se manifeste par l'apparition d'une zone transparente autour des isolats ensemencés en touches.
- Après incubation, la lecture des résultats consiste à mesurer le diamètre des halos d'inhibitions apparus autour des isolats ensemencés en touche.

2.11.2.2. Méthode de Barefoot et Klaenhammer(1983) ou méthode des puits

Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant de la souche lactique productrice de la substance antimicrobienne avec la souche indicatrice dans un milieu solide. On procède de la manière suivante

- Des cultures lactiques sont incubées sur milieu liquide MRS à 30°C pendant 18h.
- Après incubation, elles sont centrifugées à 4000rpm/10min.
- Des boîtes de Pétri sont ensemencées en masse par une culture sensible (supposée être indicatrice) dans du milieu MRS solide.
- Après solidification, des puits de 5mm de diamètre sont creusés à l'aide d'une cloche de Durham stérile.
- Les puits sont ensuite remplis par des surnageants de culture à tester, puis les boîtes sont mises à incuber à 30°C pendant 24h.
- L'effet des surnageants se traduit par la formation des halos clairs autour des puits.

- La lecture des résultats est effectuée par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions.

2.1.3. Activité antimicrobienne des isolats lactiques contre des souches pathogènes

Cette partie de notre étude est consacrée à tester l'activité inhibitrice de tous nos isolats lactiques isolés contre des bactéries pathogènes à Gram positif et à Gram négatif (Tableau6).

Les méthodes utilisées ont été détaillées précédemment (méthode de Fleming et *al.*, 1975 ; méthode de Barefoot et Klaenhammer, 1983).

2.11.3.1. Méthode de Fleming et *al.*1975

Nous avons procédé de la même façon que dans le paragraphe (2.11.2.1.) excepté que nous avons rajouté les bactéries pathogènes que nous avonsensemencées en masse dans la gélose molle à la place des bactéries lactiques et incubées à 37°C pendant 24h.

La lecture des résultats est réalisée par la mesure du diamètre des halos d'inhibitions.

2.11.3.2. Méthode de Barefoot et Klaenhammer, 1983

Pour cette étude, les souches pathogènes sontensemencées également en masse et des puits sont remplis par les surnageants de culture des isolats lactiques. Après incubation à 37°C pendant 24h, les diamètres des halos d'inhibitions sont mesurés.

Ces séries de tests ont été tous répétées trois fois.

2.1.4. Caractérisation de la nature des agents inhibiteurs

Les bactéries lactiques ont la capacité d'inhiber d'autres bactéries lactiques appartenant au même groupe ou à un groupe différent par la production d'agents inhibiteurs parmi lesquels on peut citer : l'acide lactique, le peroxyde d'oxygène, la présence de phage ou les bactériocines. Cette caractérisation est réalisée en premier lieu entre les bactéries lactiques et en second lieu contre les bactéries pathogènes et/ou d'altération. Tous les tests ont été réalisés selon la méthode de Fleming et *al.* 1975

- Entre bactéries lactiques

La production des acides organiques par les souches lactique est une cause majeure de l'inhibition des bactéries lactiques. Pour mettre en évidence l'effet de l'abaissement du pH sur le développement des souches indicatrices, l'emploi d'un milieu de culture MRS tamponné (tampon

phosphate 0.2M à pH 7 (annexe2) est utilisé. Nous avons procédé selon la méthode de Fleming et *al.*,(1975).

L'utilisation du milieu tamponné a pour but de lever toutes les inhibitions dues à l'acide lactique produites par les souches inhibitrices en comparaison avec celles obtenues avec le milieu non tamponné (milieu témoin).La lecture des résultats est réalisée en mesurant les diamètres des halos d'inhibitions.

➤ Avec les bactéries pathogènes

Selon la méthode de Fleming et *al.*,(1975), les bactéries lactiques ont étéensemencées en touches sur milieu MRS solide tamponné à pH 7 et non tamponné utilisé comme témoin. Après incubation à 30°C pendant 24h, nous avons coulé la gélose molle pré-ensemencée par les bactéries pathogènes dans les boîtes pré-incubées. Après une deuxième incubation à 37°C pendant 24h, la lecture des résultats est effectuée par la mesure du diamètre des halos d'inhibitions.

2.1.4.1. Recherche des inhibitions dues au peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques sécrètent du peroxyde d'hydrogène qui est un agent inhibiteur dont l'effet peut être levé par l'enzyme catalase (Julliard et *al.*, 1987).

Les cultures bactériennes sontensemencées en touches à la surface de deux milieux de cultures. Le premier milieu MRS tamponné à pH 7 et considéré comme témoin et sur lequel on coule 8ml de gélose molle en surfusion contenant 400µl de la souche pathogène (indicatrice). Le second milieu MRS tamponné, sur lequel on coule 8ml de gélose molle en surfusion contenant 400µl de la souche pathogène additionné de 50µl de l'enzyme catalase (1mg/ml).

Après incubation à 37°C pendant 24h, la lecture des résultats est réalisée par la comparaison de l'effet inhibiteur par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition dans les milieux en présence et en absence de catalase.

2.11.4.2. Recherche des inhibitions dues aux phages lysogènes

L'une des caractéristiques de l'effet antibactérien des phages est que chaque cellule bactérienne infectée est lysée.

Dans le but de mettre en évidence les inhibitions dues à la production des phages, nous avons procédé de la manière suivante :

On prélève des fragments de gélose dans la zone d'inhibition. Ces derniers sont suspendus dans 1ml de milieu MRS liquide stérile contenant 50 μ l de chloroforme (afin d'éliminer d'éventuelles bactéries vivantes).Après agitation, on laisse décanter 5mn puis on prélève 300 μ l du mélange que l'on ajoute à 7ml de gélose molle contenant 100 μ l de la souche indicatrice. La préparation est coulée stérilement dans une boîte de Pétri et incubé à 30°C pendant 48h.

La lecture des résultats consiste à observer s'il y a présence ou pas de plages de lyse.

Les plages de lyse traduisent la présence de phages.

2.1.4.2. Recherche des inhibitions dues aux bactériocines

Les bactéries lactiques sécrètent des bactériocines qui sont des substances protéiques et qui peuvent être dégradées par des enzymes protéolytiques. Afin de déterminer la nature de ces substances responsables de l'activité antibactérienne, les cultures lactiques sont traitées par deux enzymes protéolytiques, la trypsine (Sigma, T8803) et l'alpha-chymotrypsine (Sigma, C4129). Les enzymes sont dissoutes dans du tampon phosphate de sodium (0.01M, pH7) à une concentration finale de 1mg/ml.

➤ Effet de la trypsine

Les cultures bactériennes sont ensemencées en touches sur le milieu solide MRS tamponné, considéré comme témoin. Après incubation à 30°C pendant 24h, on coule 8ml de gélose molle contenant 400 μ l de la souche pathogène. Le second milieu MRS tamponné à pH 7 auquel on ajoute 8ml de gélose molle contenant 400 μ l de la souche pathogène additionné de 50 μ l de trypsine.

Après incubation à 37°C pendant 24h, l'activité de l'enzyme est évaluée en comparant l'effet inhibiteur par la mesure du diamètre des halos d'inhibitions en présence et en absence de l'enzyme protéolytique.

➤ Alpha-chymotrypsine

Pour cette étude, nous avons procédé de la même manière que précédemment sauf que l'on a ajouté comme enzyme l' α -chymotrypsine. Après incubation à 37°C pendant 24h, la sensibilité de l'enzyme est évaluée en comparant l'effet inhibiteur par la mesure du diamètre des halos d'inhibitions dans les deux milieux.

2.1.5. Caractérisation des bactériocines

L'une des caractéristiques des bactériocines est la thermostabilité cependant elles peuvent appartenir à la classe III si elles sont thermosensibles ou à la classe I ou II si elles sont thermorésistantes (Dortu et Thonart, 2008).

Dans le but de tester cette propriété, nous avons choisi deux températures :

- Un chauffage à 80°C pendant 15 et 30mn
- Un chauffage à 100°C pendant 15 et 30mn

Nous avons procédé selon la méthode des puits (méthode de Barefoot et Klaenhammer, 1983).

- Des cultures lactiques de 18h sur MRS liquide sont centrifugées à 5000trs/min pendant 15mn.
- Les surnageants de ces cultures productrices de substances inhibitrices sont ensuite exposés aux différentes températures.
- Les puits creusés dans la gélose solide ensemencés par les souches indicatrices sont remplis par les surnageants traités.
- Après incubation à 37°C pendant 24h, la lecture des résultats est effectuée par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions.

2.2. Mise en évidence in vitro de quelques propriétés probiotiques

2.2.1. Résistance aux conditions gastro-intestinales

Pour pouvoir exercer un rôle bénéfique sur la santé humaine, les bactéries probiotiques doivent conserver une viabilité lors du passage dans le tractus gastro-intestinal (Senocket *al.*, 2005). Elles devraient en effet, survivre à l'acidité et au stress biliaire. L'évaluation de ces potentialités probiotiques a été testée par l'exposition de nos 4 souches à ces stress selon la méthode d'Hydrominus (Hydrominus *et al.*, 2000).

2.2.1.1. Test de survie au stress acide

La capacité des bactéries lactiques à survivre dans les conditions mimant celles de l'estomac de l'homme est réalisée de la manière suivante :

Des cultures overnight (18h) sont centrifugées à 13.000rpm/4min à 4°C. Les culots bactériens sont suspendus dans 10ml de bouillon MRS ajustés à différentes valeurs de pH (2.5 ; 4.5 et 6.5). La première valeur correspond à la valeur moyenne quotidienne du pH gastrique, tandis que le pH 4.5 correspond à la valeur moyenne du pH gastrique juste après le repas. Le pH 6.5 est utilisé comme témoin. Une aliquote de chaque solution est prélevée immédiatement, au temps (t : 0

min) et après 3heures d'incubation à 37°C. Après exposition à différents pH acide et à t=0 et t=3h, des dilutions en cascades jusqu'à 10⁻⁷ ont été réalisées. Ces dilutions sont ensuiteensemencées en masse sur la gélose MRS et incubées à 37°C pendant 24 à 48h. La croissance a été déterminée par le dénombrement des cellules bactériennes à T_{0h} et T_{3h}. Le taux de survie est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \log \text{ UFC à T}_{3h} / \log \text{ UFC à T}_{0h}$$

Les tests ont été effectués en trois exemplaires.

2.2.1.2. Test de survie au stress biliaire :

La bile intestinale a une concentration moyenne de 0.3% (p/v) et le temps de séjour des aliments dans l'intestin grêle est approximativement de 4h ((Prasad *et al.*, 1998).

Les cultures de 18h ont été centrifugées à 13000rpm/10min à 4°C. Les culots sont transférés dans du bouillon MRS à 0.3%, 0.5% et 1% de sels biliaires et ajustées à différents pH 2.5 et 6.5. La croissance des cellules bactériennes a été réalisée dans les mêmes conditions que pour le stress acide à T_{0h} et T_{3h}. Le taux de survie est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \log \text{ UFC à T}_{3h} / \log \text{ UFC à T}_{0h}$$

Les tests ont été réalisés en trois exemplaires.

2.2.2. Test de sensibilité aux antibiotiques

Pour déterminer le comportement de nos souches vis-à-vis de certains antibiotiques, nous avons testés les résistances de ces dernières par diffusion sur milieu solide Hinton-Mueller (MH) par utilisation des disques d'antibiotiques commercialisés par l'institut Pasteur d'Alger (Tableau 8). A partir de cultures overnight sur MRS liquide, on a effectué un ensemencement en stries, sur milieu MRS solide. Après une incubation de 18h à 30°C, on a raclé quelques colonies (5 à 7) que l'on a ajoutées à 10ml d'eau physiologique. Après homogénéisation, les préparations ainsi préparées sontensemencées par étalement à l'aide d'écouvillon imbibé de la culture bactérienne. Après séchage des boîtes, on dépose stérilement les disques d'antibiotiques à la surface du milieu (5 à 7 par boîtes). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h. La lecture des résultats consiste à mesurer les diamètres des zones claires d'inhibitions. Nous considérons que pour un diamètre inférieur à 15mm, la souche est résistante (R) à l'antibiotique considéré tandis que pour un diamètre supérieur ou égal à 15mm elle est sensible (S) à l'antibiotique (Karam et Karam, 1994).

Tableau 8 : Les différents antibiotiques utilisés .

Antibiotiques	symboles	Charges par disque	familles	Mécanismes d'action
Amoxicilline	AX	25µg	Bêta-lactamine	Inhibiteurs de la synthèse des Enveloppes bactériennes
Amoxicilline+acide clavulanique	AMC	20+10µg		
Céphalotine	KF	50µg		
fosfomycine	FOS	15µg	Aminoside	Inhibition de la synthèse des protéines
Gentamycine	CN	10µg		
Néomycine	NE	30µg		
Erythromycine	E	15µg	Macrolide	
Pristinamycine	PT	15µg		
Tétracycline	TET	30µg	Tétracycline	
Ofloxacine	OFX	5µg	Fluoroquilonone	Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques
Ciprofloxacine	CIP	10µg		

III-RESULTATS & DISCUSSION

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Dénombrement des bactéries

Après dilutions, étalement sur MRS additionné de cycloheximide pour éliminer la flore fongique et levure, l'incubation est réalisée à 30°C pendant 24h. Les colonies correspondant aux caractéristiques des bactéries lactiques ont été isolées.

Cette étape nous a permis de mettre en évidence l'existence d'une flore lactique dans le blé traditionnellement fermenté. Le comptage des colonies a montré que le nombre de bactéries lactiques varie entre 1,6 et 5,2 x10¹⁰ufc/g. Sur ce point, certains travaux comme ceux de Corsetti et al, en 2001 et 2007 ont montré que le nombre de bactéries lactiques isolées à partir de blé italien varie respectivement de log 7,5 à 9,3 ufc/g et de 1 à 16x10²ufc/g (Corsetti et al., 2001 ; Corsetti et al., 2007). Dans le même ordre d'idée, les travaux effectués sur les farines de blé marocaines, le dénombrement des bactéries lactiques varie entre 10 et 6x10² (Ennadir et al., 2004). Toutefois, on remarque que la charge microbienne trouvée dans notre substrat est très importante par rapport à celle citée précédemment. Par ailleurs, Il est fort probable, que la charge microbienne trouvée dans le blé fermenté soit due au long séjour de ce dernier dans le silo souterrain « Matmora». En effet, certains auteurs admettent par leurs travaux que comparativement avec les produits d'origine animale, les végétaux renferment, en général un faible nombre de bactéries lactiques (Nguyen-The et Carlin, 1994).

3.2. Identification des bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté « Hamoum ».

Cent vingt-deux isolats bactériens ont été isolés à partir de nos échantillons de blé fermenté prélevé du silo dans la région de Mazouna. Ces isolements ont été réalisés sur milieux solides et liquides MRS. Les colonies ont été d'abord purifiées et ont subi un premier screening basé sur la coloration de Gram et le test de catalase. Les isolats bactériens sont désignés par la lettre **H** en référence au substrat « Hamoum » et codés selon la forme des bactéries :

BHL : en référence à la forme bacille ; **BHC** : en référence à la forme coque.

L'identification des isolats lactiques au stade genre a été conduite en utilisant une batterie de tests portant sur les caractéristiques culturelles, morphologiques (macroscopique et microscopique), physiologiques et biochimiques sur des cultures pures.

L'étude morphologique consiste à décrire l'aspect des colonies, la couleur et la taille sur milieux solides. Elle est ensuite conduite par une coloration différentielle de Gram pour écarter les bactéries Gram négatif, à observer leurs formes coques ou bâtonnets et leurs modes de

regroupements par une observation en immersion au microscope optique .Ensuite, une étude physiologique est menée à l'aide de différents tests : l'aptitude de croissance à pH 9, puis à différentes concentrations de NaCl, à différentes températures et le test de la thermorésistance. L'identification phénotypique sur le plan biochimique est réalisée par l'hydrolyse de l'arginine, l'hydrolyse de l'acétoïne, la croissance sur le lait bleu de Sherman, la mise en évidence de la production d'EPS et la détermination du type fermentaire par production de gaz (CO₂). Enfin, l'identification est complétée par la production des acides à partir des hydrates de carbone.

3.2.1. Pré-identification des isolats

❖ Examen macroscopique

L'observation macroscopique des cultures en milieux liquide a permis de constater que tous les isolats possèdent un trouble homogène indiquant une bonne croissance après 24 h d'incubation.

Sur milieux solides, l'observation a révélé plusieurs aspects morphologiques des colonies.

- Colonies circulaires, moyennes, bombées, lisses, de couleur blanchâtre ayant un contour régulier.
- Grosses colonies, bombées de couleur blanchâtre, lisses, ayant un contour distinct
- Petites colonies lisses arrondies de couleur blanche à contour distinct.

Les figures 16et 17 montrent les aspects macroscopiques des colonies cultivées sur milieux solides.



Figures 17& 18 : Aspect macroscopique de BHL1 (à gauche) ; Aspect macroscopique de l'isolat BHL10 (à droite).

❖ **Examen microscopique**

L'observation microscopique des caractères culturels montre la forme des colonies la taille, le mode de regroupement ainsi que la pureté des isolats.

Ces colonies se sont distinguées par deux formes :

- En bâtonnets courts et longs, isolés, en amas et même en palissade.
- En coques disposés en tétrade, en paire, groupés en amas et parfois en courtes chaînes.

Les figures 18 et 19 montrent les aspects des colonies après coloration Gram

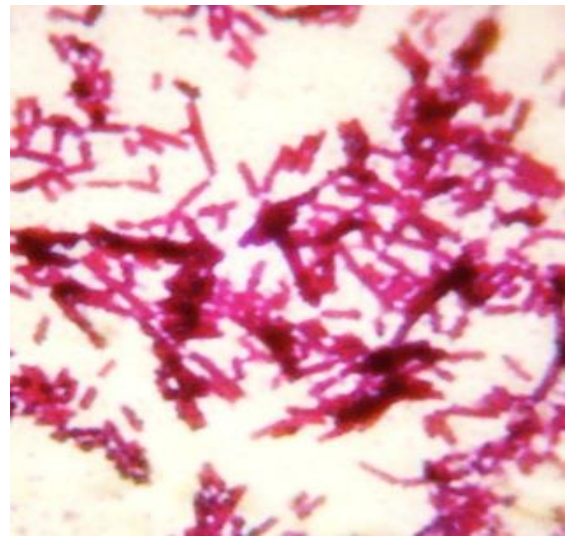
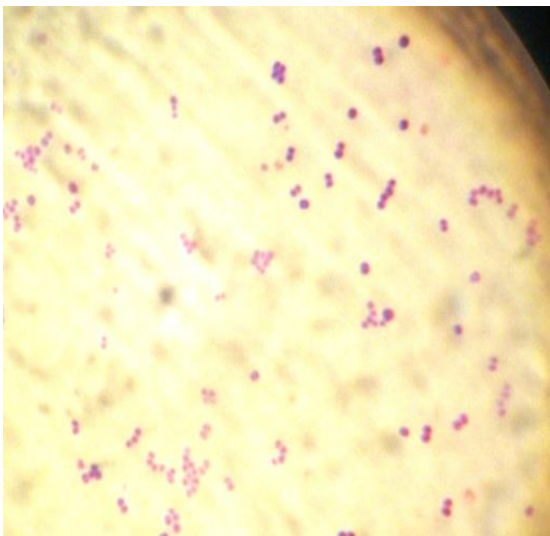


Figure 19&20 : Aspect microscopique des cellules après coloration de Gram (x1000), Cocci (à gauche), Bacille (à droite)

A l'issue des résultats macroscopiques et microscopiques et les tests de la catalase et de l'oxydase, 39 isolats ont été retenus. Les résultats des tests morphologiques ont permis de rattacher nos 39 isolats à 4 groupes de bactéries lactiques. Ce premier screening nous a permis de mettre en évidence la présence de lactobacilles et de coques à des proportions différentes (figure 21).

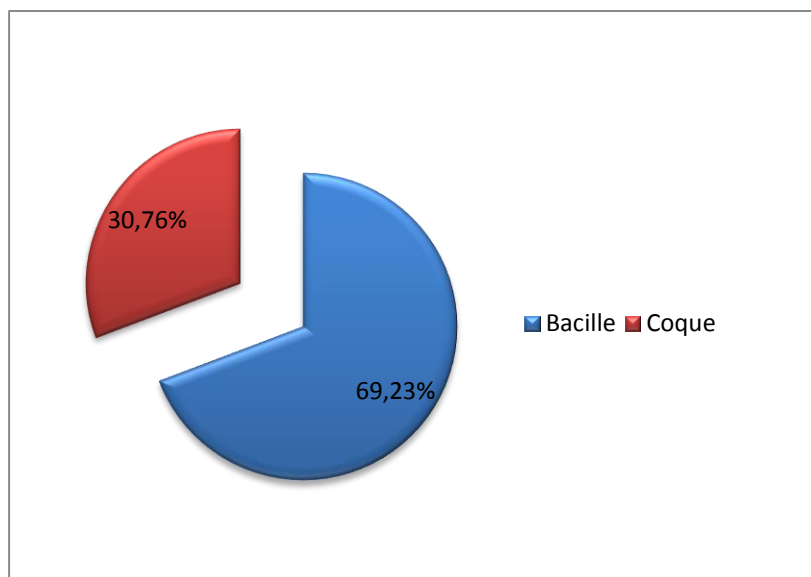


Figure 21: Proportion des bactéries lactiques

Les observations microscopique et macroscopique, La coloration de Gram et le test de la catalase nous permettent de définir les isolats en quatre groupes différents (Tableau 9).

Tableau 7: Résultats de la pré-identification des isolats

	Micro morphologie	Test de la catalase	Coloration Gram	Nombre d'isolats
Colonies transparentes très petites et rondes	Cocci, en chaînette	-	+	3
Colonies lisses, arrondies blanchâtre	Cocci en diplocoque et en tétrades	-	+	6
Petites colonies blanchâtres, bombées et rondes	Bâtonnets longs, isolés	-	+	27
Colonies blanches et rondes	Cocci en chaînette	-	+	3

3.2.2. Etude des caractères biochimiques et physiologiques des bactéries lactiques.

Dans cette partie, l'approche utilisée pour l'identification de nos isolats est basée essentiellement sur la caractérisation phénotypique. Cette dernière repose sur des critères morphologiques, biochimiques et physiologiques.

Apartir des résultats de la caractérisation des bactéries lactiques par les méthodes phénotypiques qui sont regroupés dans les tableaux 10 et 11 plusieurs remarques peuvent être faites :

Croissance à différentes températures : ce test permet de distinguer entre la flore mésophile et thermophile.

A 37°C, toutes les bactéries se développent à cette température.

A10, 15, 30, 37 et 45°C : la majorité des bactéries sont capables de se développer à 15°C, 30°C, 37°C et 45°C indiquant qu'elles sont thermophiles à l'exception des isolats BHC10, BHC11 BHC12 qui sont mésophiles.

La thermorésistance : l'exposition des isolats à une température de 60°C pendant 30 min permet de révéler que tous les isolats ont résisté à cette température à l'exception de BHC10, BHC11, BHC12.

Au pH 9.6 : l'ensemble des bactéries ont une croissance en milieu alcalin, excepté les isolats BHC8, BHC9, BHC10, BHC11, BHC12.

NaCl : l'ensemble des isolats sont résistants aux concentrations de 2,4, 5 et 6,5% de NaCl à l'exception des isolats BHC10, BHC11, BHC12, BHC 23, BHC24, BHC25, BHC26, BHC27 qui sont sensibles à 6,5%. Les isolats BHC8 et BHC9 n'ont présentés aucune croissance aux concentrations de NaCl testées.

Aucune croissance n'a été observée à 7% de NaCl.

Lait bleu de Sherman : Les résultats du test de lait bleu de Sherman révèlent que tous les isolats ayant une forme cocci coagulent le lait et réduisent le milieu à une concentration de 0,1% de bleu de méthylène.

En revanche, à la concentration de 0,3%, seuls les isolats BHC1, BHC2 et BHC3 se sont révélés sensibles. Tous les isolats en forme de bacille ont coagulé le lait et ont réduit le milieu excepté les isolats BHL1, BHL2 et BHL3.

Les résultats du test du type fermentaire : ce test a permis de différencier entre les isolats hétérofermentaires et homofermentaires en utilisant un milieu liquide contenant du glucose muni d'une cloche de Durham.

Tableau 8: Caractérisation physiologique des bactéries lactiques

Isolats	Températures °C					Thermorésistance (60°C, 30mm)	pH		Concentrations de NaCl (%)				
	10	15	30	37	45		6,5	9,6	2	4	5	6,5	7
BHC1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHC2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHC3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHC4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHC5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHC6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHC7	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHC8	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
BHC9	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
BHC10	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
BHC11	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
BHC12	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
BHL1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL4	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL5	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL6	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL7	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL8	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL9	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL10	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL11	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BHL23	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
BHL24	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
BHL25	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
BHL26	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
BHL27	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-

+ : réaction positive ; - : réaction négative ; +/- : faible croissance.

La présence de gaz (CO₂) dans la cloche de Durham indique un métabolisme hétérofermentaire. Ce test a permis de sélectionner 3 isolats en forme de coque hétérofermentaires. Parmi les isolats homofermentaires décelés, on distingue 9 coques et 27 lactobacilles. On remarque toutefois que le groupe homofermentaire est prépondérant dans les cultures de nos bactéries lactiques.

Test de l'ADH : à travers les résultats, nous pouvons conclure que parmi la collection d'isolats, certains n'ont pas la capacité d'hydrolyser l'arginine. En effet, le catabolisme de l'arginine se manifeste par une coloration violette (ADH+).

Parmi les isolats ADH-, nous citons : BHC8, BHC9, BHC10, BHC11, BHC12, BHL8, BHL9, BHL10, BHL12, BHL13, BHL14, BHL15, BHL16, BHL17, BHL18, BHL19, BHL20, BHL21, BHL22, sont ADH-

Test Esc : L'hydrolyse de l'esculine se traduit par un noircissement sur milieu à esculine gélosé (figure 16). Nous remarquons que tous les isolats se sont révélés positifs à ce test à l'exception de BHL23, BHL24, BHL25, BHL26 et BHL27.

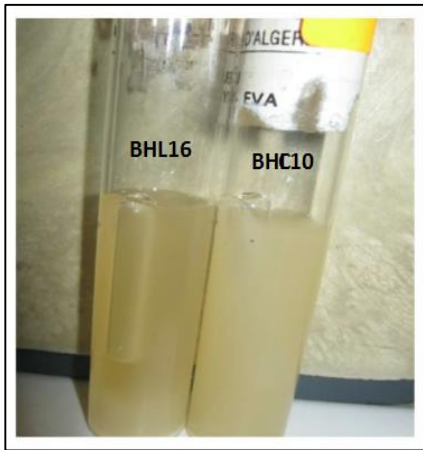
Test de l'ACT : La production d'acétoïne est caractérisée par l'apparition d'un anneau rouge à la surface du milieu. Parmi les bactéries ayant la capacité de produire de l'acétoïne, nous citons les isolats cocci, BHC4, BHC5, BHC6, BHC7 ainsi que les isolats bacilles BHL23, BHL24, BHL25, BHL26 et BHL27.

Test de l'EPS : Les isolats cultivés sur milieu MSE sont apparus sous forme de grosses colonies larges, de consistance visqueuse, à contour irrégulier et de couleur blanchâtre. Trois coques et cinq bâtonnets se sont avérés producteurs d'EPS. Il s'agit de BHC10, BHC11 BHC12, BHL23, BHL24, BHL25, BHL26 et BHL27.

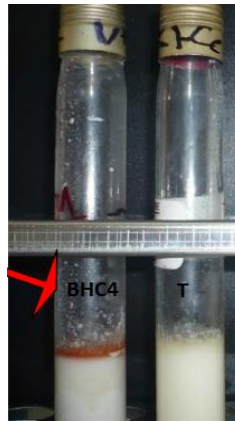
Tableau 9: Caractérisation biochimique des bactéries lactiques.

Isolats	GAZ	ADH	ESC	ACT	DEXT	Lait de Sherman	
						0,1%	0,3%
BHC1	-	+	+	-	-	+	-
BHC2	-	+	+	-	-	+	-
BHC3	-	+	+	-	-	+	-
BHC4	-	+	+	+	ND	+	-
BHC5	-	+	+	+	ND	+	-
BHC6	-	+	+	+	ND	+	-
BHC7	-	+	+	+	ND	+	-
BHC8	-	-	+	-	ND	+	-
BHC9	-	-	+	-	ND	+	-
BHC10	+	-	+	-	+	+	-
BHC11	+	-	+	-	+	+	-
BHC12	+	-	+	-	+	+	-
BHL1	+	+	+	-	-	+	-
BHL2	+	+	+	-	-	+	-
BHL3	+	+	+	-	-	+	-
BHL4	-	+	+	-	-	+	-
BHL5	-	+	+	-	-	+	-
BHL6	-	+	+	-	-	+	-
BHL7	-	+	+	-	-	+	-
BHL8	-	+	+	-	-	+	-
BHL9	-	+	+	-	-	+	-
BHL10	-	+	+	-	-	+	-
BHL11	-	+	+	-	-	+	-
BHL12	-	-	+	-	-	+	+
BHL13	-	-	+	-	-	+	+
BHL14	-	-	+	-	-	+	+
BHL15	-	-	+	-	-	+	+
BHL16	-	-	+	-	-	+	+
BHL17	-	-	+	-	-	+	+
BHL18	-	-	+	-	-	+	+
BHL19	-	-	+	-	-	+	+
BHL20	-	-	+	-	-	+	+
BHL21	-	-	+	-	-	+	+
BHL22	-	-	+	-	-	+	+
BHL23	+	+	-	+	+	+	+
BHL24	+	+	-	+	+	+	+
BHL25	+	+	-	+	+	+	+
BHL26	+	+	-	+	+	+	+
BHL27	+	+	-	+	+	+	+

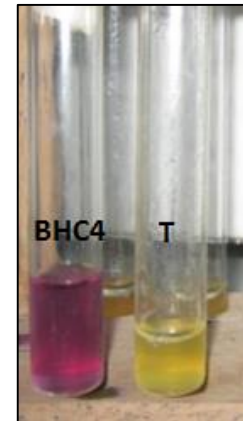
+ : réaction positive ; - : réaction négative ; Gaz : production de gaz partir du glucose ; ADH : production de l'arginine dihydrolase ; ESC : hydrolyse de l'esculine ; ACT : production d'acétoïne ; DEXT : production de dextrane



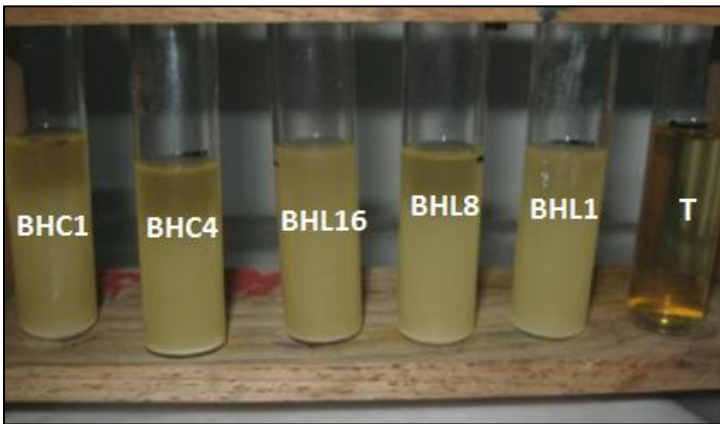
Type fermentaire



V.P



ADH



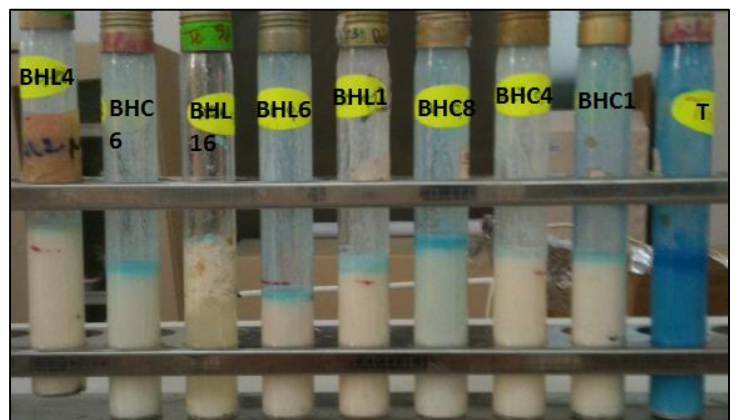
pH 9,6



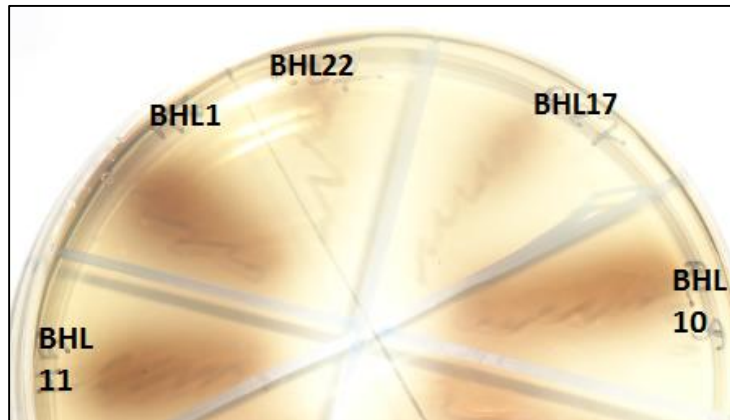
Thermorésistance



Réduction de BM 0,3%



Réduction de BM 0,1%



Hydrolyse de l'esculine

Figure 22 : Tests de caractérisation phénotypique des bactéries lactiques. T : témoin.

Globalement, les caractères phénotypiques (cultureux, physiologiques et biochimiques) ont permis de rattacher nos 39 isolats à 4 genres par ordre de dominance, résultats représentés dans la figure 23.

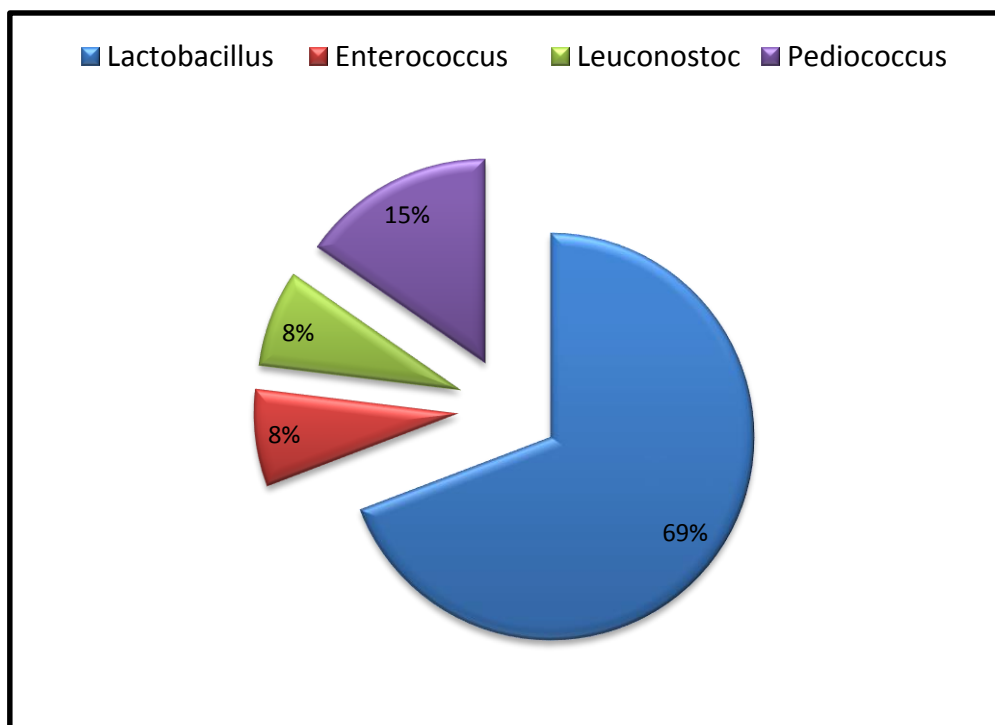


Figure 23 : Répartition des genres à partir des différents isolats de blé fermenté.

Lb : *Lactobacillus* ; En : *Enterococcus* ; L : *Leuconostoc* ; P : *Pediococcus*

L'étude de la fermentation des carbohydrates va compléter les caractérisations physiologiques et biochimiques réalisées et permettre de nous diriger vers la détermination de l'espèce bactérienne présumée.

Tableau 10: Profils fermentaire des isolats lactiques

Sucres Isolats	G	Mal	Lac	Raf	Man	Xyl	Ara	Fr	Gal	Sa	Sor	Rham	Tré	Cell
BHC1	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
BHC2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
BHC3	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
BHC4	+	-	V	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
BHC5	+	-	V	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
BHC6	+	-	V	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
BHC7	+	-	V	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
BHC8	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
BHC9	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
BHC10	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
BHL11	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
BHL12	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
BHL1	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
BHL2	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
BHL3	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
BHL4	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
BHL5	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
BHL6	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
BHL7	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
BHL8	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
BHL9	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
BHL10	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
BHL11	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
BHL12	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL13	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL14	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL15	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL16	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL17	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL18	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL19	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL20	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL21	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL22	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL23	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL24	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL25	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL26	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
BHL27	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+

+: réaction positive ; - : réaction négative ; V : variable (plus de 10% et moins de 90% de réactions positives);G :Glucose ; Mal : Maltose ; Lac : Lactose ; Raf : Raffinose ; Man : Mannose ; Xyl : Xylose ; Ara : Arabinose ; Fr : Fructose ; Gal : Galactose ; Sac : Saccharose ; Sor : Sorbitol ; Rham : Rhamnose ; Tré : Tréhalose ; Cell : Cellobiose.

La pré-identification des isolats est réalisée par l'étude des profils de fermentation des carbohydrates. En effet, la fermentation des carbohydrates entraine une acidification qui se traduit par un virage de l'indicateur coloré du rouge pourpre au jaune attestant un résultat positif. Ceci est attribué à la production d'acide lactique par les souches après catabolisme des sucres fermentescibles. Les résultats des profils fermentaires sont représentés dans le tableau12.

En se référant aux différents tests réalisés, les 39 isolats sont répartis de la manière suivante :

Douze isolats ont une forme cocci en paire, en chaînette, groupés et/ou en amas. Parmi ces derniers, trois isolats codés BHC1, BHC 2et BHC3 ont donné un résultat positif à ces différents tests : thermorésistance, croissance à 15°C et 45°C, pH9.6 Ils se sont développés en présence de 6.5% de NaCl et ont également coagulés et réduit le lait contenant 0.1% de bleu de méthylène. La différenciation entre les genres *Enterococcus* et *Lactococcus* repose sur la croissance en présence de 6.5% NaCl, à pH 9.6, à 45°C et réduisent le milieu lait contenant 0.1% de bleu de méthylène (Devriese et Pot.1995 ; Badis et *al.*, 2004). A la concentration de 0,3% de BM, parmi les isolats cocci, seuls BHC1, BHC2 et BHC3 n'ont ni réduit, ni coagulé le lait. Ces caractéristiques répondent aux critères que possèdent les entérocoques, ce qui nous conduit à classer ces trois isolats dans le genre *Enterococcus*. Ils présentent également un caractère homofermentaire, hydrolysent l'esculine et l'arginine et ne produisent pas l'acétoïne. La fermentation de l'arabinose nous permet de conclure que ces trois isolats appartiennent à l'espèce *Enterococcus faecium* (Devriese et *al.*, 1993). En outre, ces isolats sont capables d'utiliser le lactose, le maltose, le glucose, le tréhalose mais incapables d'utiliser le sorbitol, le xylose, le galactose, le raffinose et le mannose (Thapa et *al.*, 2006 ;Ennadir et *al.*, 2014). Ces espèces ont également été identifiées dans les farines provenant du Maroc, de la France et d'Italie.

Trois autres isolats codés BHC10, BHC11 et BHC12 présentent une forme lenticulaire, un caractère hétérofermentaire, hydrolysent l'esculine et ne produisent pas d'acétoïne. Ils synthétisent les EPS visualisés par des colonies visqueuses, ils sont incapablesd'hydrolyser l'arginine, sedéveloppent à des températures de 15°C mais pas à 45°C et tolèrent une concentration élevée de 5% de NaCl mais pas de 6,5%. Ces bactéries sont incapables de survivre après leur exposition à une température de 60°C pendant 30mn. Elles ne fermentent ni le galactose, ni le raffinose, ni le rhamnose, ni le cellobiose et ni le sorbitol (Thapa et *al.*, 2006 ; Kheddid et *al.*, 2006). En revanche, ils fermentent l'arabinose, le tréhalose et produisent du dextrane (Garvie, 1984 ; Björkroth et

Holzapfel, 2003). Ces isolats arabinose positifs, produisant du dextrane peuvent être identifiés aux sous espèces *Leuconostoc mesenteroides* sp *mesenteroides* (Carr et al., 2002).

Concernant les six derniers isolats cocci, BHC4, BHC5, BHC6, BHC7, BHC8 et BHC9, ils forment des colonies rondes qui au microscope optique révèlent une forme en tétrades caractéristiques du genre *Pediococcus*. Ces isolats homofermentaires sont capables de se développer à 45°C mais pas à 15°C et se développent à la concentration de 6,5% de NaCl. Les isolats BHC4, BHC5, BHC6 et BHC7 hydrolysent l'arginine, trait caractéristique de l'espèce *Pediococcus acidilactici* (Carr et al., 2002). En outre, ils ont la capacité de fermenter le glucose, le fructose, le cellobiose, le tréhalose et le saccharose. (Kheddid et al., 2006, Ennadir et al., 2014). Quant aux autres isolats BHC8 et BHC9, ils sont incapables d'hydrolyser l'arginine (Carr et al., 2002), ne tolèrent pas un pH de 9,6 et ne se développent pas aux différentes concentrations de NaCl. Le profil de ces isolats se distingue par leur capacité à fermenter le maltose. Ces isolats peuvent être identifiés à *Pediococcus pentosaceus* (Ennadir et al., 2014 ; Kheddid et al., 2006).

Les 27 bactéries, isolées à partir de blé fermenté, en forme de bacille sont représentées par le genre *Lactobacillus*. Ce sont des cellules dont la morphologie varie de coccobacille à bacilles sous forme de bâtonnets longs ou courts isolés ou associés en chaînettes ou en diplocoques et/ou en amas.

Sur la base des différentes températures de croissance, de l'hydrolyse de l'arginine et du type fermentaire, le genre *Lactobacillus* est subdivisé en 3 groupes (Tableau 13).

Tableau 11: les différents groupes du genre *Lactobacillus* selon Hammes et Hertel, 2003 ; Axelsson, 2004.

	Croissance à		ADH	Production de gaz	
	15°C	45°C		Glucose	Gluconate
<i>Streptobacterium</i>	+	V	-	-	+
<i>Thermobacterium</i>	-	+	-	-	-
<i>Betabacterium</i>	+	V	+	+	+

Les bactéries homofermentaires mésophiles font partie du groupe II *Streptobacterium* tandis que les bactéries homofermentaires thermophiles appartiennent au groupe I *Thermobacterium*. Le groupe III *Betabacterium* renferme les bactéries hétérofermentaires mésophiles (Hammes et Hertel, 2003 ; Axelsson, 2004).

❖ Le groupe I *Thermobacterium* :

Les bactéries appartenant à ce groupe sont représentées dans notre étude par BHL4, BHL5, BHL6, BHL7, BHL8, BHL9, BHL10 et BHL11. Ces isolats sont homofermentaires, thermophiles, incapables de décarboxyler l'arginine, hydrolysent l'esculine, se développent à une concentration de 6.5% de NaCl et réduisent le milieu lait à 0.1 et 0.3% de BM. Ils sont incapables d'utiliser le raffinose, l'arabinose, le xylose, le lactose, le cellobiose, le sorbitol, le tréhalose et le saccharose. Ces isolats ont été pré-identifiés parmi l'espèce *Lactobacillus amylophilus* (Hammes et Vogel, 1995 ; Hammes et Hertel, 2006).

❖ Le groupe II *Streptobacterium* :

Ce groupe renferme 16 isolats dont 11 isolats codés BHL12, BHL13, BHL14, BHL15, BHL16, BHL17, BHL18, BHL19, BHL20, BHL21 et BHL22 sont homofermentaires thermophiles. Ils ne produisent pas de NH₃ à partir de l'arginine (Collins et al., 1989) et hydrolysent l'esculine. Ils tolèrent une concentration de 6.5% de NaCl. Ils sont capables d'utiliser le glucose, le maltose, le lactose, le galactose, le cellobiose, le sorbitol, le tréhalose, le fructose et le saccharose. Ces isolats se rapprochent de l'espèce *Lactobacillus plantarum* (Ennadir et al., 2014). Quant aux 5 isolats restants codés BHL23, BHL24, BHL25, BHL26 et BHL27, ils sont homofermentaires thermophiles. Ils hydrolysent l'arginine et l'acétoïne mais pas l'esculine et ne se développent pas à 6,5% de NaCl. Ces isolats sont capables d'utiliser l'ensemble des sucres testés sauf le raffinose, l'arabinose, le rhamnose et le xylose. Ces isolats ont été pré-identifiés à l'espèce *Lactobacillus casei* (Hammes et Hertel, 2006).

❖ Le groupe III *Betabacterium* :

Ces 3 isolats codés BHL1, BHL2, et BHL3 sont hétérofermentaires, mésophiles, hydrolysent l'arginine et l'esculine mais pas l'acétoïne. Ils sont capables d'utiliser l'ensemble des sucres testés à l'exception du rhamnose, du sorbitol, du xylose, du cellobiose et du tréhalose. Toutes ces propriétés nous laissent suggérer que ces isolats sont représentatifs de l'espèce *Lactobacillus brevis* (Hammes et Hertel, 2006).

Tableau 12: Tableau récapitulatif des résultats des tests de pré-identification des bactéries lactiques.

Genres	Espèces	Codes
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	BHC1, BHC2, BHC3
<i>Leuconostoc</i>	<i>Mesenteroïdes ssp mesenteroïdes</i>	BHC10, BHC11, BHC12
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>	BHC4 , BHC5, BHC6, BHC7
	<i>pentosaceus</i>	BHC8, BHC9
<i>Lactobacillus</i>	<i>amylophilus</i>	BHL4, BHL5, BHL6, BHL7, BHL8, BHL9, BHL10, BHL11
	<i>brevis</i>	BHL1, BHL2, BHL3
	<i>Plantarum</i>	BHL12, BHL13, BHL14, BHL15, BHL16, BHL17, BHL18, BHL19, BHL20, BHL21, BHL22
	<i>casei</i>	BHL23, BHL24, BHL25, BHL26, BHL27.

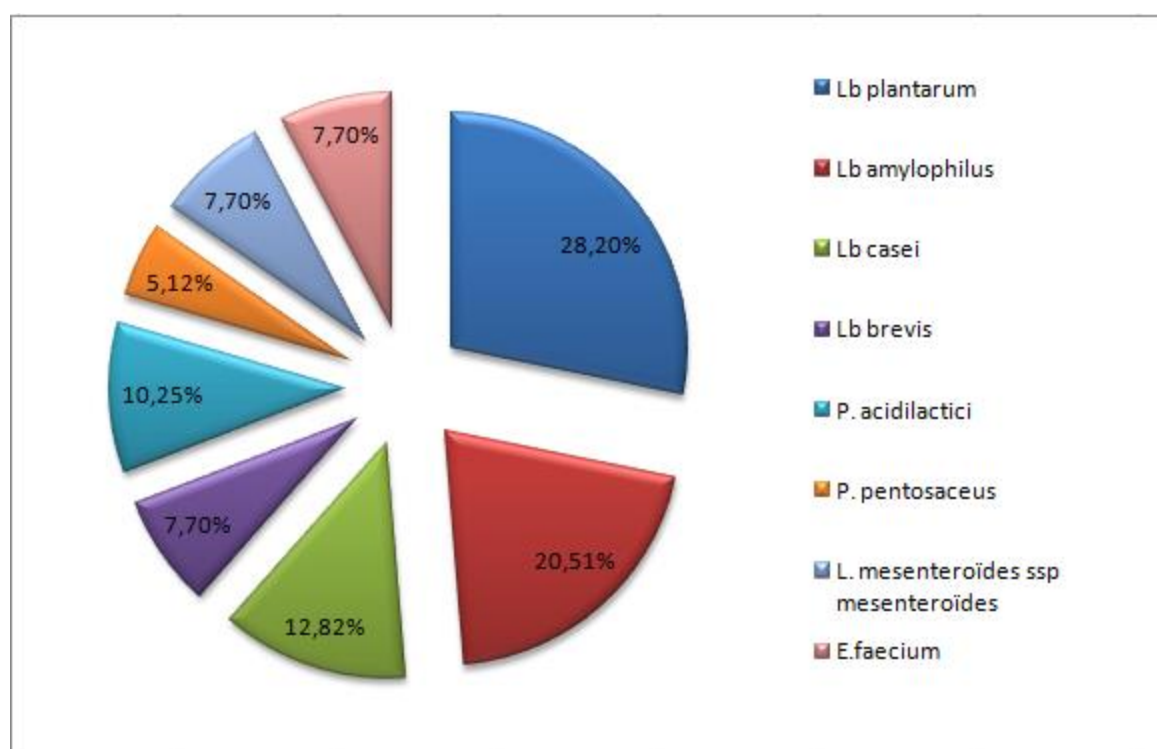


Figure 24: Distribution quantitative des espèces présumées de bactéries lactiques.

Dans la présente étude, 4 genres et 8 espèces provenant du blé fermenté ont été pré-identifiées dans le blé fermenté. Au cours de l'évolution de la fermentation, une communauté de bactéries

lactiques composée principalement de *Lactobacillus* s'est installée, en association avec d'autres espèces minoritaires des genres *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Enterococcus*. On remarque toutefois qu'à l'exception des 3 isolats lactiques (BHC10, BHC11 et BHC12) tous les autres se développent à 45°C et survivent à l'exposition à la température de 60°C pendant 30mn. Cette résistance à la chaleur correspond probablement à une adaptation aux conditions de confinement pendant le stockage souterrain.

La fermentation du blé est dominée par les espèces de lactobacilles homofermentaires, en particulier *L. plantarum*. En effet, Humblot et Guyot, (2009) ont rapporté une évolution similaire des bactéries lactiques dans les bouillies fermentées de millet, dans lesquelles seuls les représentants des Lactobacillaceae (*Lactobacillus*), des *Leuconostocaceae* et des *Enterococcaceae* ont été détectés.

Les espèces identifiées dans nos échantillons de blé fermenté sont en accord avec les populations de bactéries lactiques décrites par les auteurs des travaux de recherche sur les aliments fermentés à base de céréales. *Lb. brevis*, *En. faecium*, et *P. pentosaceus* sont rapportés comme étant présents en association, ou non, dans divers aliments fermentés à base de céréales tels que *hussuwa* (Yousif et al., 2010), *potopoto* (Abriouel et al., 2006), *ben-saalga* (Touet et al., 2007) et *koko* (Lei and Jakobsen, 2004).

Des auteurs ont montré la présence de *Lb. brevis* dans les produits amyliques non alcoolisés à base de céréales (Yao et al., 2009). Concernant la souche *Lb casei* identifié dans le blé fermenté, il a été également détecté dans les levains traditionnels de blé mûr à un taux assez élevé (Reale et al., 2011). Cette espèce a été isolée à partir d'un ferment produit à l'aide d'une farine fermenté et représente 8,7% des souches isolées (Faid et al., 1994). Elle a été aussi décrite auparavant par Spicher (1983) comme espèce naturelle de la fermentation du pain au seigle en Allemagne.

L'espèce *Ln mesenteroides* sp *mesenteroides* est présente dans différents levains de blé albanais (Nionelli et al., 2014), de blé traditionnel des pays européens (Robert et al., 2006 ; Robert et al., 2009), de levain Iranien de Shangak (Azar et al., 1977) et des levains panaires traditionnels marocains (Faid et al., 1994). Les leuconostocs sont naturellement présents sur les végétaux cultivés, la betterave à sucre, dans le lait et produits laitiers fermentés et carnés. L'espèce *Ln mesenteroides* sp *mesenteroides* est utilisée pour son rôle texturant antibactérien et aromatique dans plusieurs produits alimentaires (Devoyod et Poullain, 1988 ; Benmechernene et al., 2013).

En ce qui concerne le genre *Pediococcus*, les isolats obtenus sont présumés être *P. acidilactici* et *P. pentocaseus*. Parmi les bactéries lactiques isolées, à partir de farine de blé, ce

genre est représentatif de la flore lactique (Ennadiret *al.*, 2014). Dans le même ordre d'idée, certains auteurs ont avancé que *Pediococcus pentosaceus* était la seule espèce de ce genre qui a été détectée dans tous les levains étudiés et peut être appliquée comme démarreur de la production de pain au levain (Katina et *al.*, 2002 ; Paramithiotis et *al.*, 2005). Des auteurs ont trouvé que *P. pentosaceus* est la seule espèce isolée dans tous les levains étudiés (DeVuystet Neysens ,2005 ; DeVuyst et Vancanneyt, 2007).

Concernant les entérocoques, ils sont présents dans trois échantillons uniquement représentés par l'espèce *En .faecium*. Ce sont des bactéries lactiques utilisées depuis des siècles dans la transformation des aliments. Les entérocoques jouent un rôle essentiel dans la conservation (prolongation du temps de stockage) et dans la qualité bactériologique des aliments, tout en respectant leurs propriétés nutritionnelles et organoleptiques (Galvez et *al.*, 2011). D'ailleurs, Ennadir et *al.* (2014) ont constaté que cette espèce est moins fréquente dans la farine de blé d'origine marocaine, contrairement aux travaux de Corsetti et *al.* (2007), qui indiquent que les entérocoques représentés par les deux espèces *Enterococcus faecium* et *Enterococcus mundtii* sont dominantes dans ce produit ((Ennadir et *al.*, 2014 ; Corsetti et *al.*,2007).

Les entérocoques sont également présents sur les parties aériennes des végétaux (céréales et plantes fourragères) (Devriese et *al.*, 1993 ; Franz et *al.*, 1999 ; Mundt et Hammer .1968) et participent à la fermentation des aliments(Mundt et Hammer.1968 ; Franz et *al.*,1999). Signalons à ce propos que dans la littérature, ce genre est le plus controversé des bactéries lactiques. Certains auteurs le considèrent comme agent d'altération tandis que d'autres l'admettent comme un élément contribuant positivement à la maturation et au développement de la flaveur des produits (Ammor et *al.*, 2005 ; Moreno et *al.*, 2006 ; Gracia et *al.*, 2007 ; Ruiz-Moyano et *al.*, 2008).

En résumé, on remarque que les genres identifiés dans notre étude sont présents dans les différentes investigations menées sur les farines de blé d'origine marocaine, italienne et française et également sur les levains traditionnels de blé de différentes origines.

L'approche adoptée pour l'identification de nos isolats au niveau de l'espèce est basée essentiellement sur les caractéristiques physiologiques et biochimiques.

Bien que cette caractérisation phénotypique constitue une étape fondamentale et préliminaire, elle reste néanmoins sommaire et imprécise. En effet, une identification claire et précise jusqu'à l'espèce et même à la sous espèce est difficile par les méthodes phénotypiques classiques tel que le profil fermentaire à cause du nombre élevé des espèces de bactéries lactiques qui diffèrent par un nombre restreint de caractères biochimiques (Quere et *al.*, 1997). Avec le

développement de nouvelles techniques, en particulier le MALDI-TOF MS, la caractérisation et l'identification bactériennes se sont révélées plus efficaces car elles nécessitent une petite colonie et une matrice. D'autant plus que cette technique est rapide, fiable et à moindre coût par rapport aux autres techniques moléculaires utilisées pour l'identification microbienne. Donc, afin d'attribuer des profils fiables à nos isolats, une caractérisation moléculaire s'avère indispensable.

3.3. Caractérisation des bactéries lactiques isolées à partir du blé fermenté par MALDI-TOF MS

Une quinzaine d'isolats bactériens ont été soumis à une analyse de cellule entière de type MALDI-TOF MS. Cette méthode discrimine les bactéries sur la base du criblage des pics observés en tant que biomarqueurs protéiques pour l'identification des bactéries (Hollande et al., 1996). Cette stratégie est améliorée par l'utilisation d'une ou plusieurs souches de références pour chacune des espèces qui doivent être incluses dans la base de données (Williams et al., 2003 ; Chen et al., 2008).

Dans notre cas, le traitement des données a été réalisé par le logiciel MALDI BioTyper TM4.0 (MALDI Biotyper4.0 Data base BruckerDaltonics, Germany).

L'identification des spectres des isolats bactériens a été réalisée à l'aide d'un algorithme de reconnaissance qui considère les positions des pics dont l'intensité correspond à une échelle de 1 à 1000 (Bright et al., 2002 ;Freiwald et al., 2009). Le logiciel génère automatiquement les listes de pics à partir de tous les spectres et extrait les pics typiques qui sont présents dans les spectres répertoriés pour une espèce donnée.

Les figures24 à 30 illustrent les spectres de masse recueillis des 4 isolats bactériens réalisés par le logiciel MALDI-TOF MS BiotyperBrucker.

Tableau 13: Identification des isolats bactériens par MALDI-TOF MS.

Isolats	Identification	Score	NCBI à identifier
BHL 27	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.023	1590
BHL 23	Lactobacillus plantarum	2.064	1590
BHL8	<i>Lactobacillus brevis</i>	2.201	1580
BHC6	<i>Pediococcusacidilactici</i>	1.77	1254

Un matching score ou score d'appariement et de fiabilité d'identification, basé sur les masses identifiées et la corrélation de leurs intensités est généré et utilisé pour classer les résultats.

Un score supérieur à 2.000 ou compris entre 2.000 et 3.000 indique une bonne fiabilité et une forte probabilité de l'identification de l'espèce. Le rang du genre, à ce score étant totalement sécurisé (Gidenn, 2001 ; Blondiaux, 2013).

Tableau 14: Score de concordance des spectres obtenus à partir d'une bactérie d'intérêt avec ceux de la base de données Biotyper, reflétant le degré de confiance à accorder à l'identification.

Score	Description	Symbole
2,300 – 3,000	Forte probabilité d'identification à l'espèce	+++
2,000 – 2,299	Identification du genre sécurisée, identification à l'espèce probable	++
1,700 – 1,999	Identification au genre probable	+
0,000 – 1,699	Degré de confiance insuffisant pour l'identification	-

Selon les données présentées dans le tableau 15 et les figures 17 à 33, nous déduisons que :

- 3 isolats ont été identifiés au rang de genre sécurisé (score >2.000) et l'espèce probable
- 1 isolat a été identifié au rang de genre probable (score > 1.700).

Les isolats soumis à l'analyse protéomique sont identifiés comme suit :

BHL27 : *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 DSM

BHL23 : *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 DSM

BHL 8 : *Lactobacillus brevis* DSM 1268 DSM

BHC 6 : *Pediococcus acidilactici*146 RLT

En comparant les résultats de l'identification phénotypique avec ceux obtenus par MALDI-TOF MS, on constate que seule l'espèce *Pediococcus acidilactici* (BHC6) a été identifiée par les deux méthodes. En ce qui concerne *Lactobacillus* (BHL23, BHL27) identifiés par la méthode phénotypique comme *Lactobacillus casei*, les résultats protéomique ont montré que ces isolats sont *Lactobacillus plantarum*.

La caractérisation protéomique a permis l'identification de 4 bactéries lactiques avec de bons scores.

L'analyse protéomique a montré que les bactéries lactiques les plus fréquemment détectées sont les lactobacilles essentiellement représentés par l'espèce *Lactobacillus plantarum*. En effet,

cette dernière a été isolée à partir de nombreux substrats à base de céréales (blé, mil, sorgho, maïs et seigle). Il est connu comme groupe majoritaire de la microflore lactique des produits traditionnels (pâte ou purée et bouillies non alcoolisées) obtenus à partir du mil, sorgho et maïs en Afrique de l'Ouest (Yao et al 2009 ; Louembé et al., 2003). *Lactobacillus plantarum* est l'espèce qui a été isolée des levains de seigle russe et finlandais en tant que microorganisme prédominant (Rosenquist et Hansen, 2000). Il a également été détecté à partir du levain traditionnel de blé iranien (Golshan et al., 2014) et albanais (Nionelliet al., 2014). C'est un groupe qui fait partie des bactéries commensales dont l'utilisation est courante comme probiotique chez les êtres humains et animaux (Ouwehand et al., 2002).

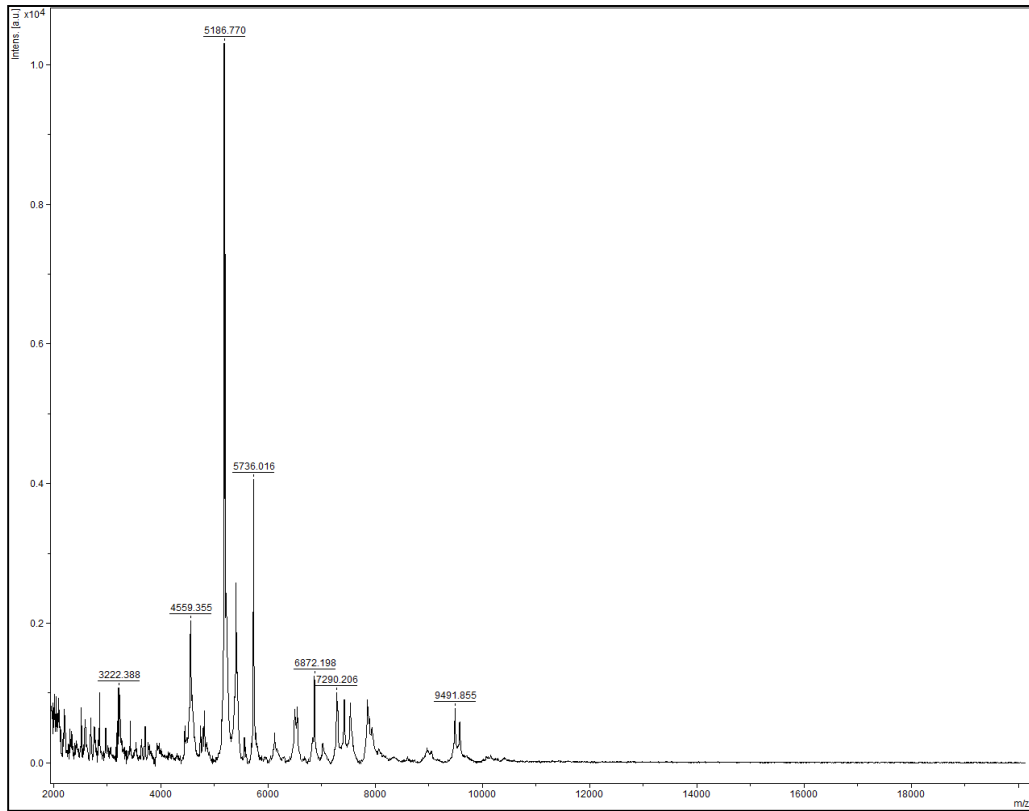


Figure 25 : Spectre de *Lactobacillus plantarum* BHL23

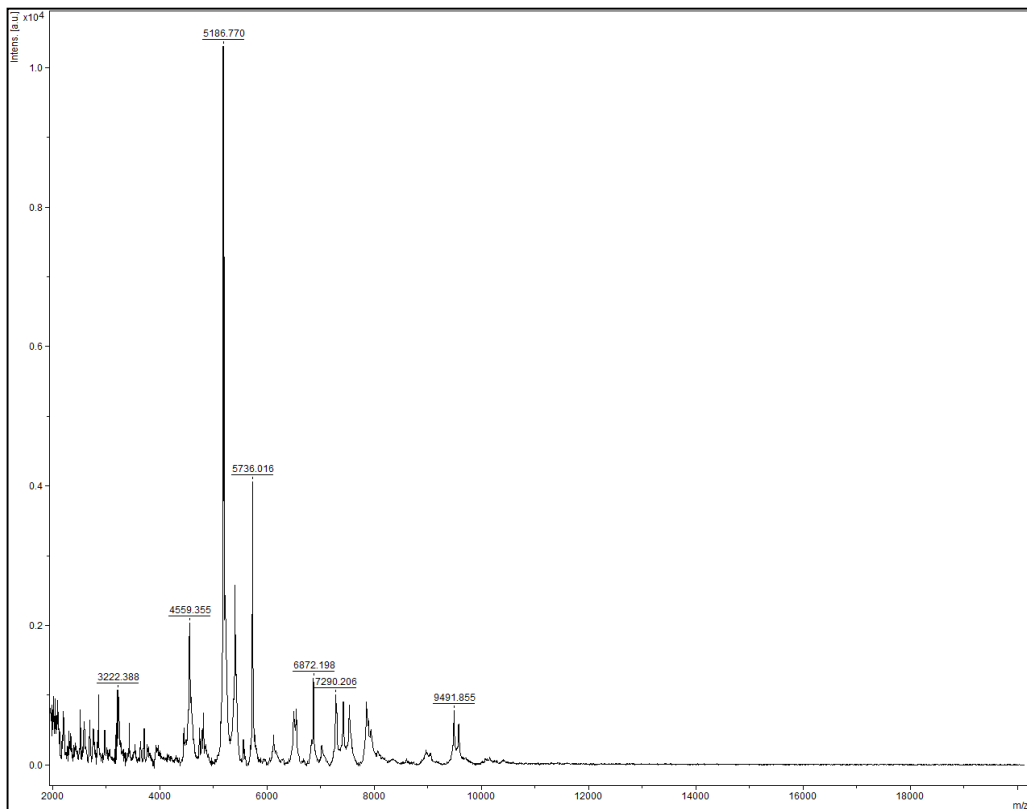


Figure26 : Spectre de *Lactobacillus plantarum* BHL27

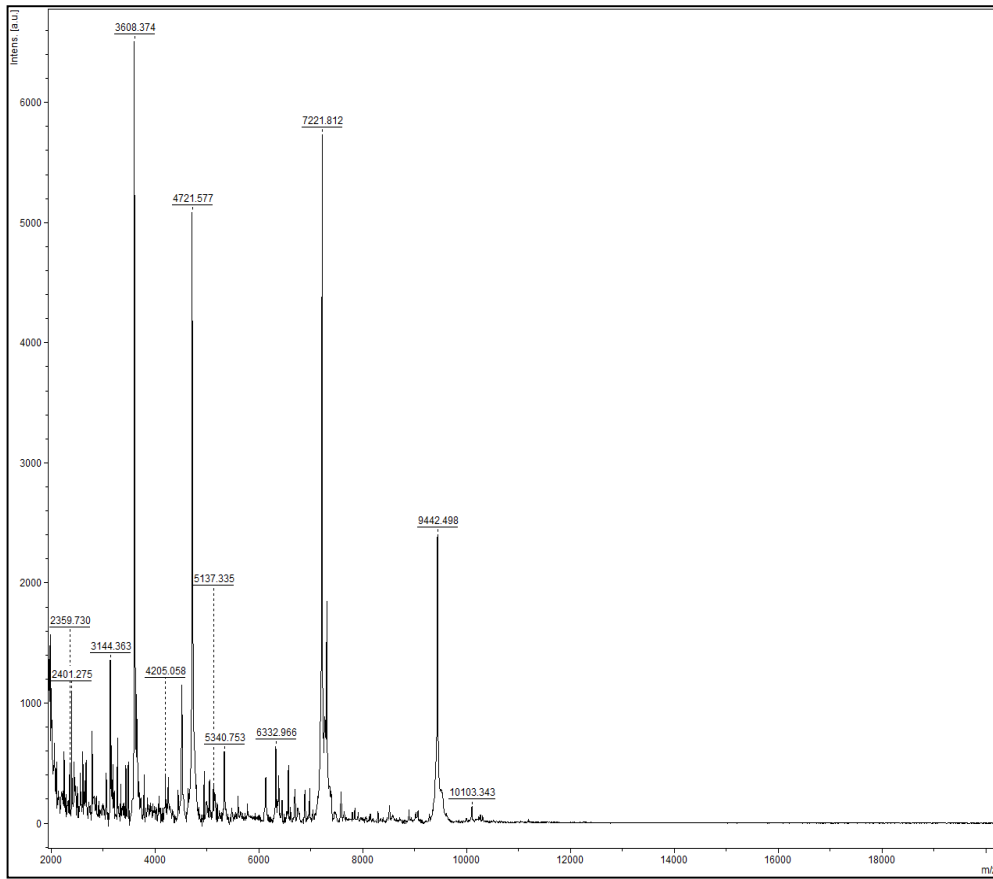


Figure27 : Spectre de *Lactobacillus brevis* BHL8

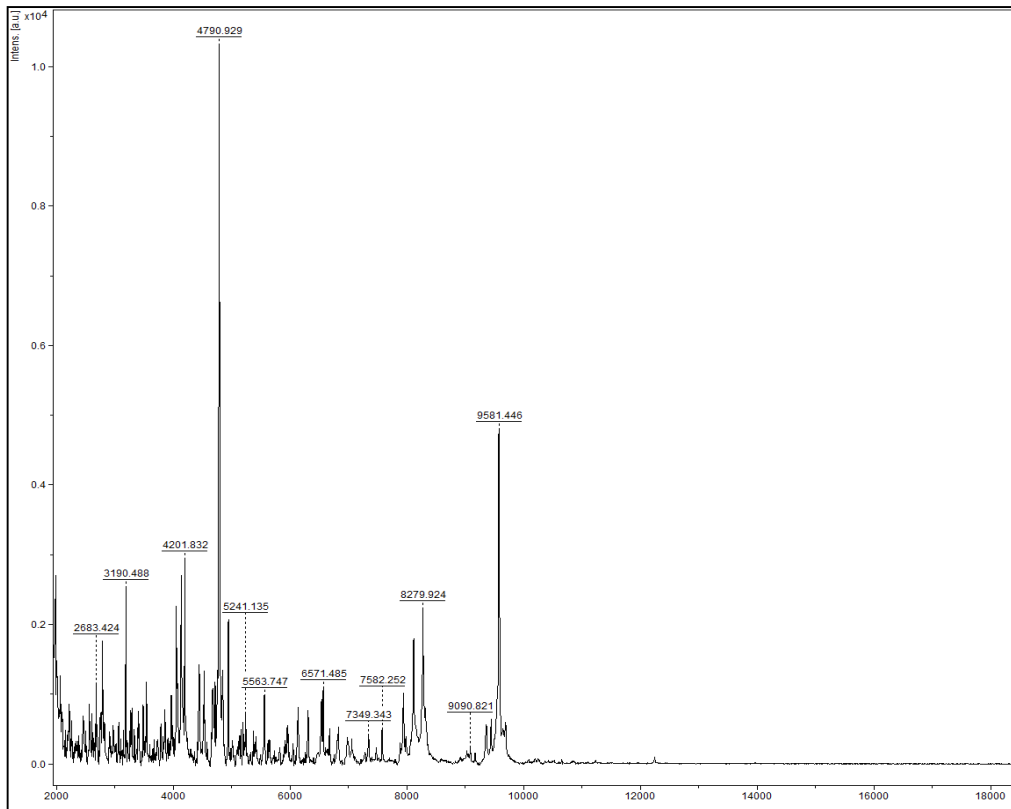


Figure 28 : Spectre de *Pediococcus acidilactici* BHC6

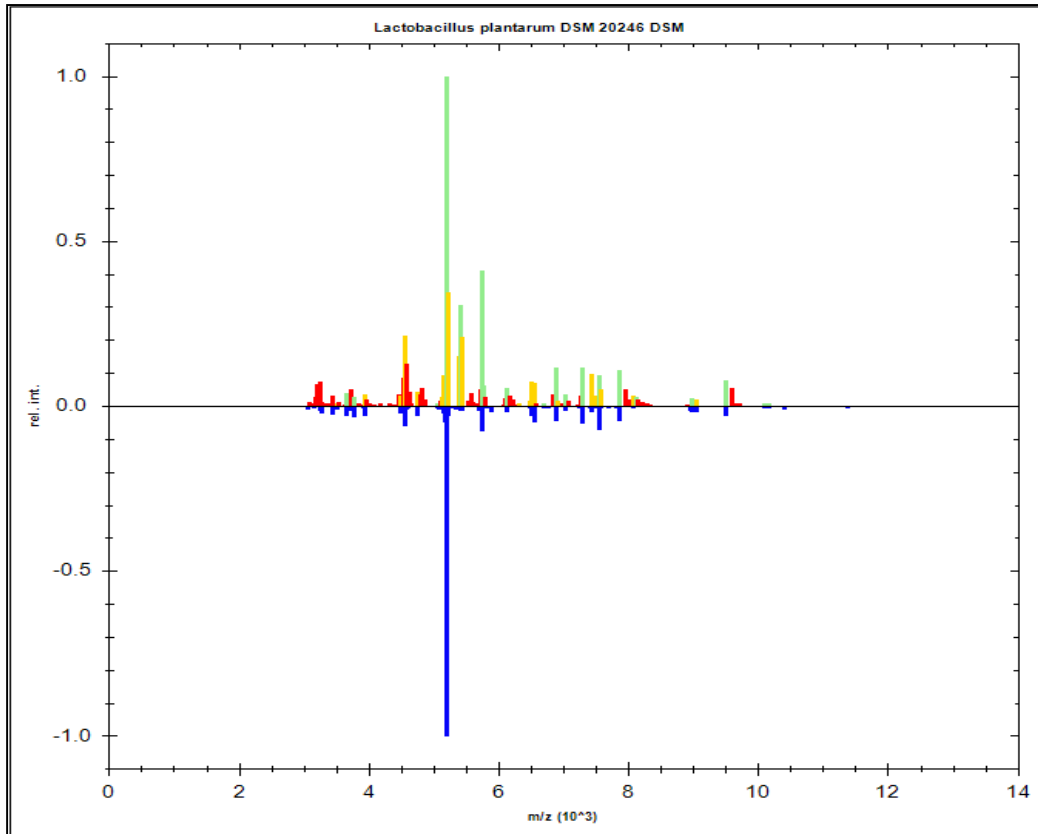


Figure 29 : Spectre à pic *Lactobacillus plantarum* BHL23

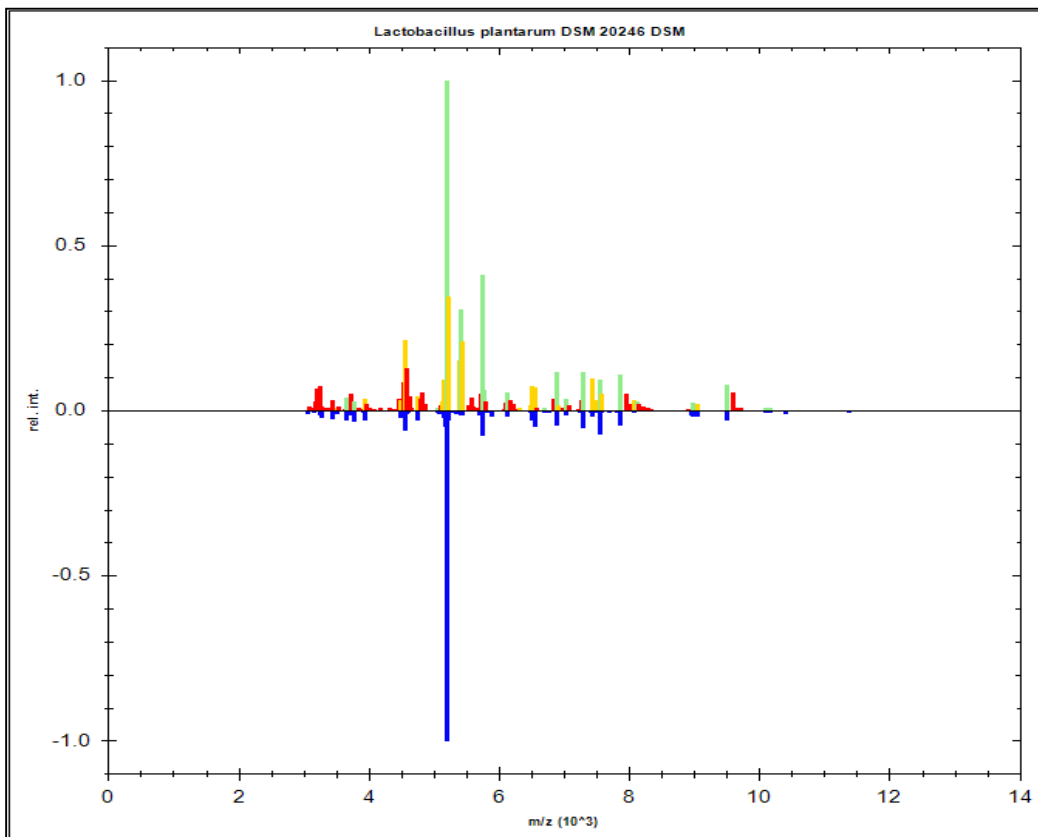


Figure 30 : Spectre à pic *Lactobacillus plantarum* BHL27

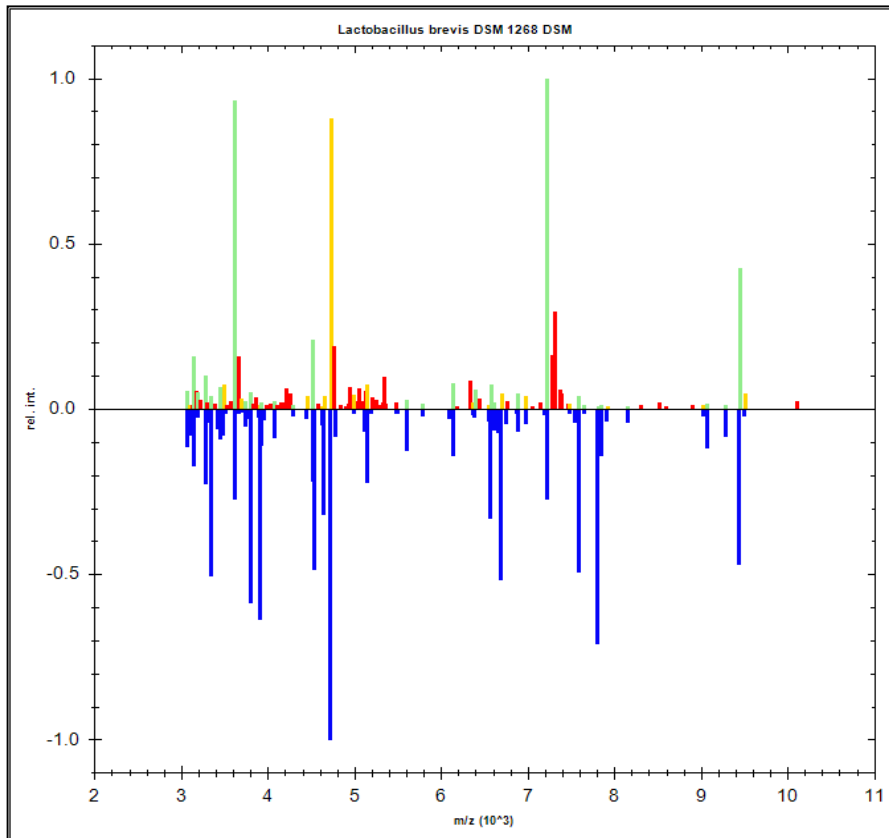


Figure 31 : Spectre à pic *Lactobacillus brevis* BHL8

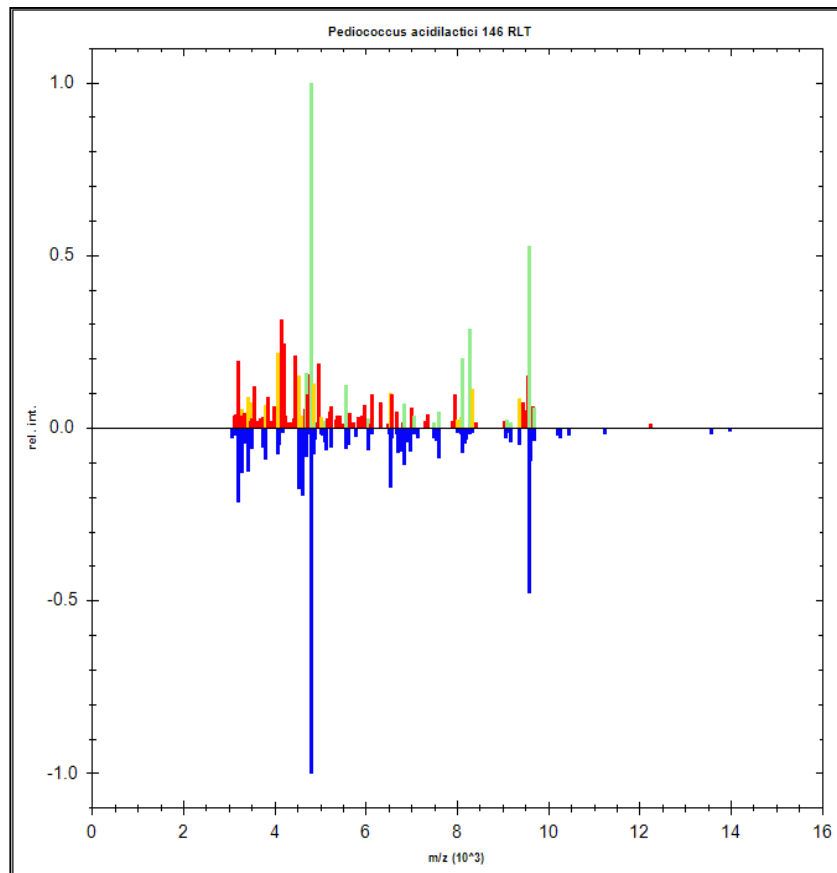


Figure 32 : Spectre à pic de *Pediococcus acidilactici* BHC6

L'espèce *Lactobacillus plantarum* est décrite comme très active dans la fermentation panaière (Lonner et Preve-Akesson, 1988). Des auteurs ont rapporté que parmi les bactéries lactiques isolées des farines, les espèces *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus pentosaceus* sont les plus fréquentes et représentent plus de 85% des isolats homofermentaires (DeVuyst et Neysens, 2005 ; DeVuyst et Vancanneyt, 2007 ; Corsetti et Settani, 2007). L'espèce *Lactobacillus plantarum* est une espèce communément isolée à des fréquences variables de différents produits fermentés, des levains, des produits laitiers et des produits végétaux (Tanasupawat et al., 1992 ; Tanasupawat et al., 2002). Gobbetti et al. (1995) et Corsetti et al. (2001) ont rapporté que l'espèce *Lactobacillus plantarum* a été isolée des farines italiennes avec une faible fréquence. Contrairement aux travaux effectués par Ricciardi et al. (2005) sur le levain utilisé dans la préparation du pain traditionnel du blé dur italien, le microorganisme le plus dominant est *Lactobacillus plantarum* avec une fréquence de 49%. Quant à l'espèce *Lactobacillus brevis*, elle est présente dans les produits amylicés non alcoolisés.

Lactobacillus plantarum et *Lactobacillus brevis* sont deux espèces qui sont présentes dans la fermentation d'un grand nombre de variété de produits alimentaires carnés (Rhee et al., 2011 ; Kröckel et al., 2013) et également dans les fruits, légumes et plantes (Karavoicova et Kohajdova, 2003 ; Rhee et al., 2011 ; Swain et al., 2014). Ces deux espèces sont aussi connues en tant qu'agents altérants dans le jus et la bière (Arena et Manca de Nadra, 2001 ; Fguiri et al., 2012).

L'espèce *Pediococcus acidilactici* est une espèce majoritaire présente dans les farines de blé marocaines (Ennadir et al., 2014) rejoignant les travaux de Hardy (1982), Bervas (1991) et Infantes et Tourneur (1991) lors de leurs investigations sur la microflore lactique des farines de blé français. Dans le blé fermenté, cette espèce a été détectée seulement dans 4 échantillons. Louembé et al. (2003) ont signalé qu'en général, les pediococques sont fréquemment isolés de plusieurs produits végétaux. En outre, le genre *Pediococcus* a été détecté dans les produits végétaux (céréales, choucroute, olives, concombre) et les produits fermentés (bière) (Louembé et al., 2003).

3.4. Etude du pouvoir acidifiant des souches lactiques isolées à partir de blé fermenté.

C'est principalement pour leur activité acidifiante que les industries agroalimentaires utilisent les bactéries lactiques, car elle est considérée comme critère primordial de sélection des souches lactiques à intérêt en technologie laitière.

L'activité acidifiante de nos quatre souches lactiques *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* et *Pediococcus acidilactici* sélectionnées et isolées de blé fermenté a été évaluée après 24h d'incubation à 37°C. Le suivi de l'activité acidifiante des souches est réalisé sur milieu lacté exempt

de cellules viables. L'acidité dans les produits laitiers est exprimée en degré Dornic (1°Dornic= 0,1g/l d'acide lactique).

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 17 (annexe 2) et illustrés à l'aide des figures 32, 33, 34,35 et 36.

Les résultats montrent une évolution progressive en acide lactique au cours du temps, accompagné d'un abaissement du pH du milieu.

Après 4h d'incubation, les valeurs du pH varient entre 6,67 et 6,47 parallèlement, la quantité d'acide lactique produite se situe entre 1,25 et 2,30 g/L. Au bout de 24h d'incubation, les valeurs de pH diminuent sensiblement jusqu'à atteindre un pH de 5,21 suivi d'une quantité d'acide lactique produite de 2,9g/l

Les espèces *Pediococcus acidilactici* (BHC6) et *Lactobacillus plantarum* (BHL23) provoquent une diminution du pH du lait de 6.67 à 5,21 au bout de 24h de fermentation. Par ailleurs, on remarque que le comportement acidifiant de nos bactéries varie d'une souche à l'autre. En effet, on constate que les valeurs d'acidification sont comprises entre 29 et 53°D.

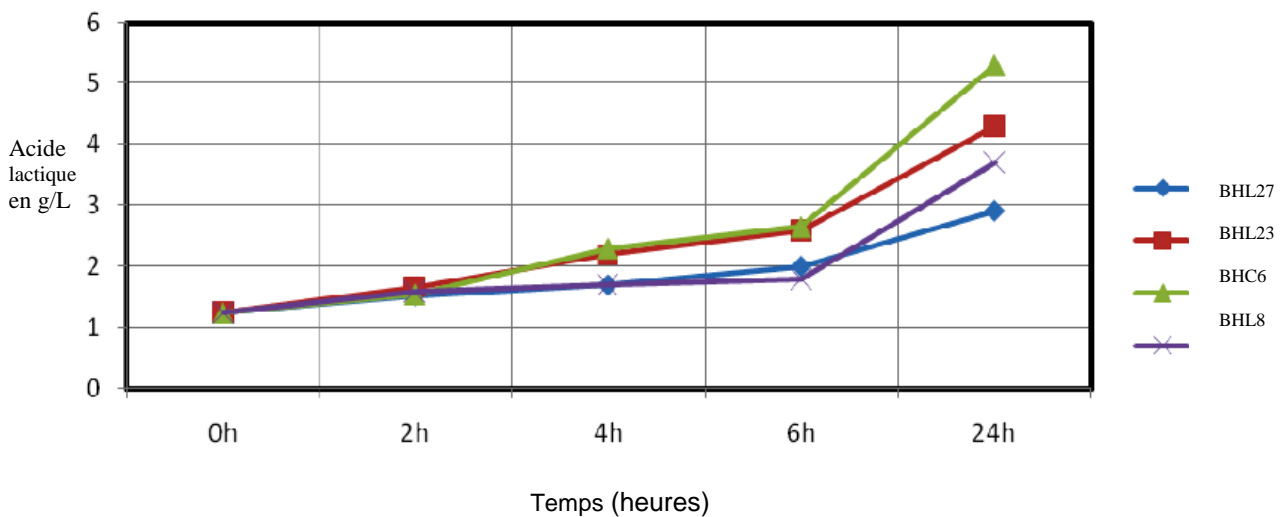


Figure 33: Evaluation de la quantité d'acide lactique produite au cours du temps chez les souches testées.

La quantité d'acide lactique la plus élevée produite a été enregistrée chez *Pediococcus acidilactici* 53°D (BHC 6) et la plus faible 29°D chez *Lactobacillus plantarum* (BHL23). En ce qui concerne *Lactobacillus plantarum* (BHL27) et *Lactobacillus brevis* (BHL8), la quantité d'acide lactique produite par ces souches est de 2,9 et 3,7g/l respectivement.

Nos souches lactiques ont montré une capacité faible d'acidification du lait, car le pH enregistré pendant les 6 premières heures demeure presque inchangé. Après 24h d'incubation, il est similaire pour *Lb. plantarum* (BHL23) et *Lb. brevis* (BHL8) et diminue pour *P. acidilactici* (BHC6) et *Lb. plantarum* (BHL27). Aucune des 4 souches n'a montré un profil d'acidification performant car après 6h d'incubation à 37°C aucune souche n'a été capable de baisser le pH au-delà de 6,45.

Ces résultats ont permis de classer les souches *Lb plantarum* (BHL23) et *P. acidilactici* (BHC6) dans la catégorie des bactéries moyennement acidifiantes (79°D > acidité > 40°D) et les souches *Lb. plantarum* (BHL27) et *Lb. brevis* (BHL8) dans la catégorie des bactéries faiblement acidifiantes. Une différence dans la réduction du pH et la production d'acide entre les genres, les espèces et parfois entre les souches de la même espèce a été soulevée par de nombreux auteurs (Alonso-Calleja et al., 2002 ; Luquet et Corrieu, 2005).

Selon ces résultats, on pourrait suggérer que les souches ayant une activité moyennement acidifiante pourraient être proposées dans l'industrie laitière, où ils conduisent une diminution du pH qui joue un rôle important et essentiel dans la coagulation du lait en déstabilisant la caséine d'une part et d'autre part en donnant au produit une spécificité du goût, contribuant ainsi à la saveur et la production d'arômes (Tamine et Robinson, 1999 ; Singh et al., 2006).

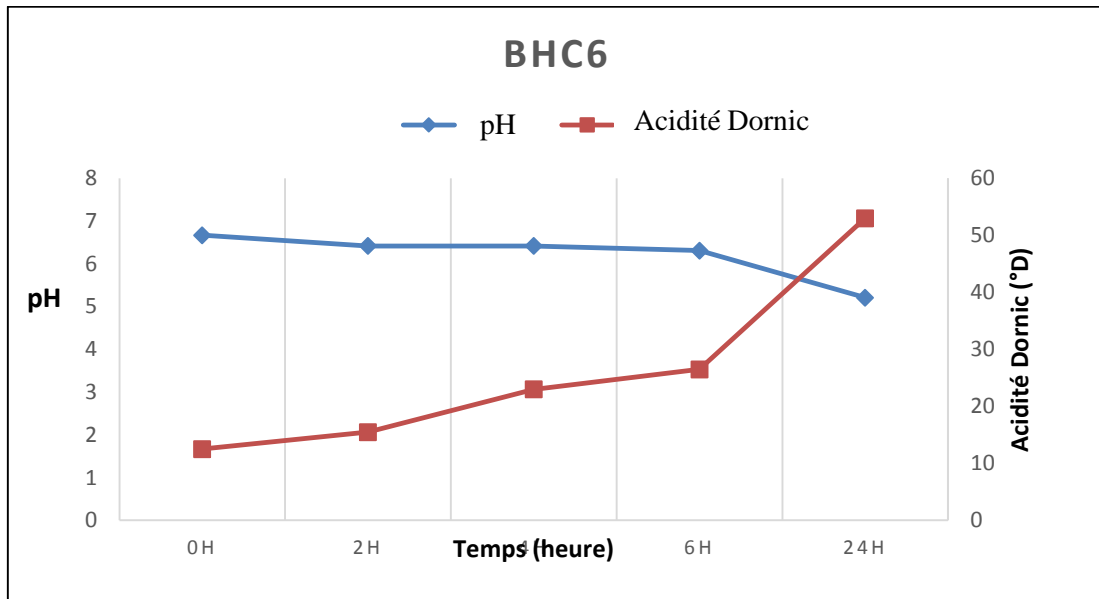


Figure 34 : Evolution de la concentration d'acide lactique et du pH de la souche *Pediococcus acidilactici* (BHC6).

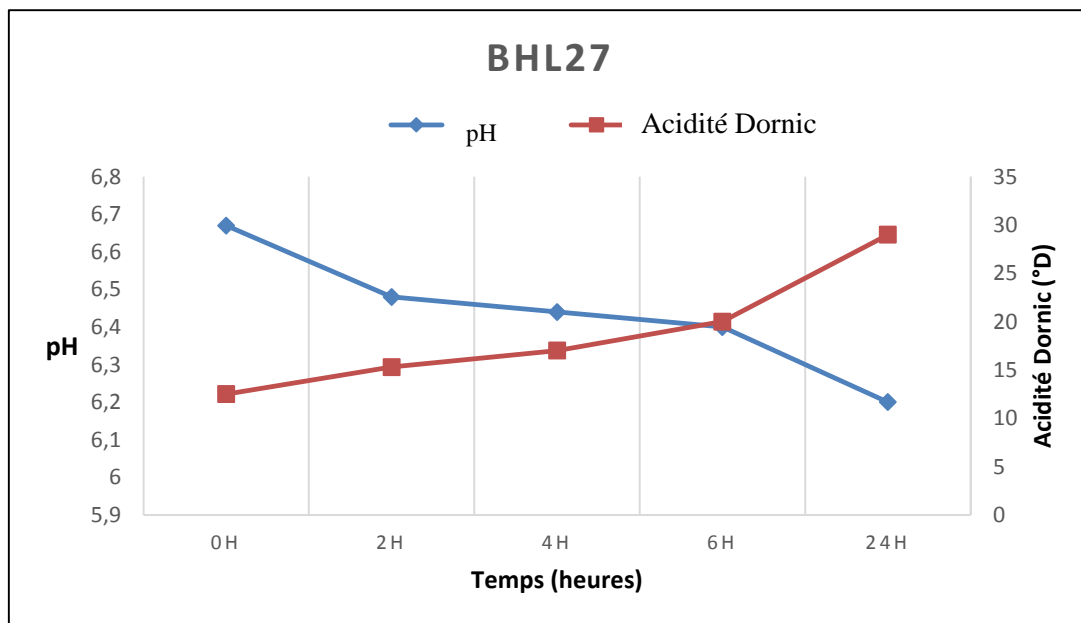


Figure 35 : Evolution de la concentration d'acide lactique et du pH de la souche *Lactobacillus plantarum* (BHL27).

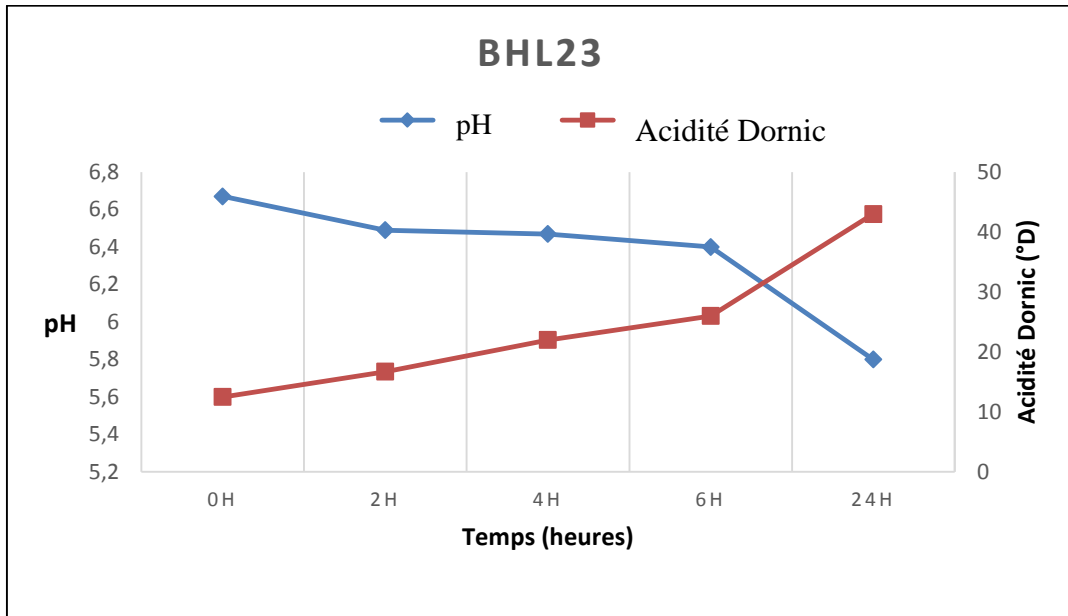


Figure36 : Evolution la concentration d'acide lactique et du pH de la souche *Lactobacillus plantarum* (BHL23).

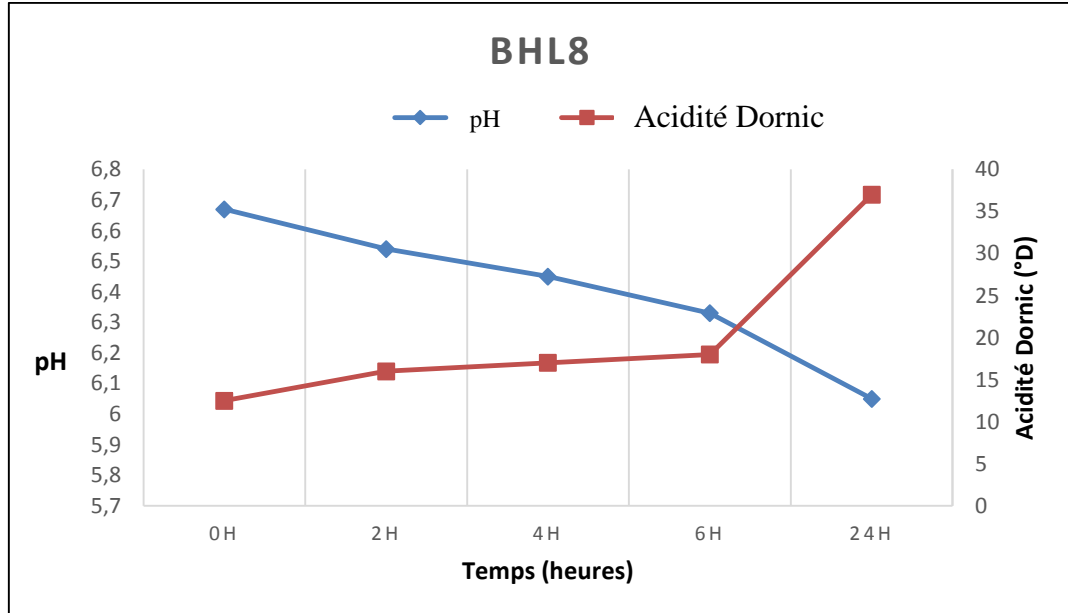


Figure 37 : Evolution la concentration d'acide lactique et du pH de la souche *Lactobacillus brevis* (BHL8).

3.5. Mise en évidence des inhibitions inter-bactériennes

3.5.1. Par la méthode de Fleming et *al.*,(1975)

Afin de déterminer le spectre de l'activité antimicrobienne entre les bactéries lactiques, nous avons réalisé une mise en évidence des inhibitions entre bactérie par contact direct par la méthode de Fleming et *al.*,(1975). Cette méthode permet d'évaluer l'effet antagoniste par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions. Chacune des bactéries de nos échantillons a été testée comme inhibitrice et indicatrice.

Nous avons effectué 789 combinaisons entre différents genres et différentes espèces. Les zones d'inhibitions observées sont claires avec un contour régulier et bien distinct, les diamètres varient entre 5 et 27mm. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux 18a, 18b, 18c, 18d, 18e, et 18f (Annexe 2) et un exemple illustre les inhibitions inter-bactériennes est représenté par la figure 38.

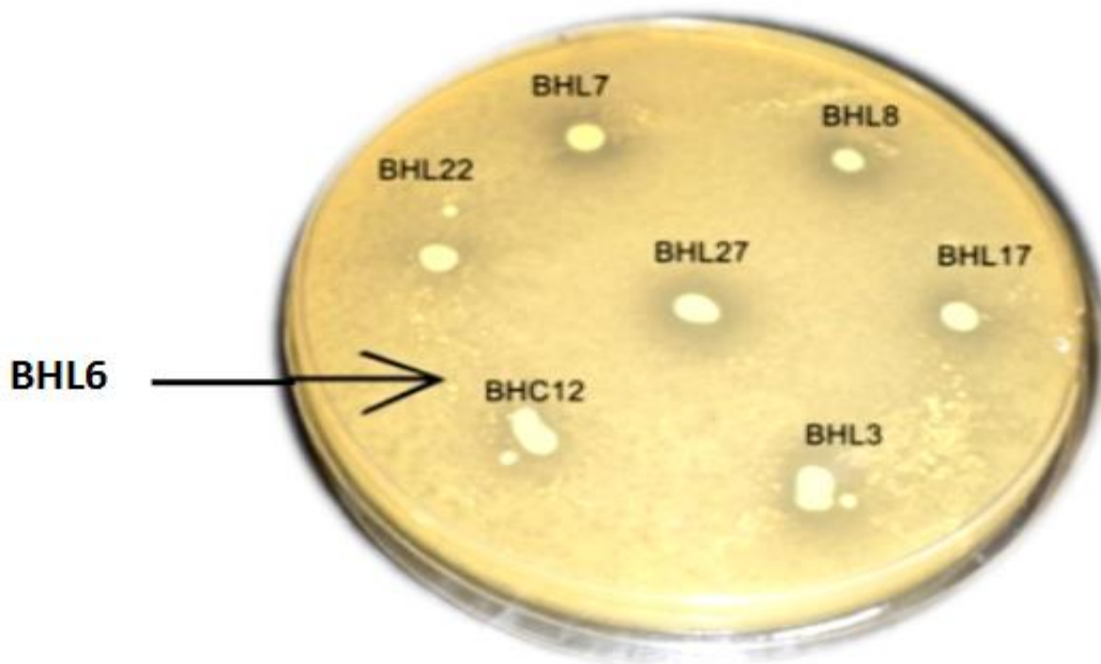


Figure 38 : Inhibitions des isolats lactiques par BHL6

A partir de ces résultats obtenus et les figures 37,38, 39 et 40 on peut noter les points suivants :

- On observe 88,9% de cas d'inhibitions et 11,10% d'absence d'inhibition
- On observe 98,60% de cas d'inter-inhibitions parmi l'ensemble des inhibitions et 1,40% d'auto-inhibitions.

- 88,9% des interactions sont des inhibitions présentant un diamètre d'inhibition compris entre 05 et 27mm.

- Le taux des inhibitions exercés par *Lactobacillus* contre le genre *Lactobacillus* est de 62,05%.

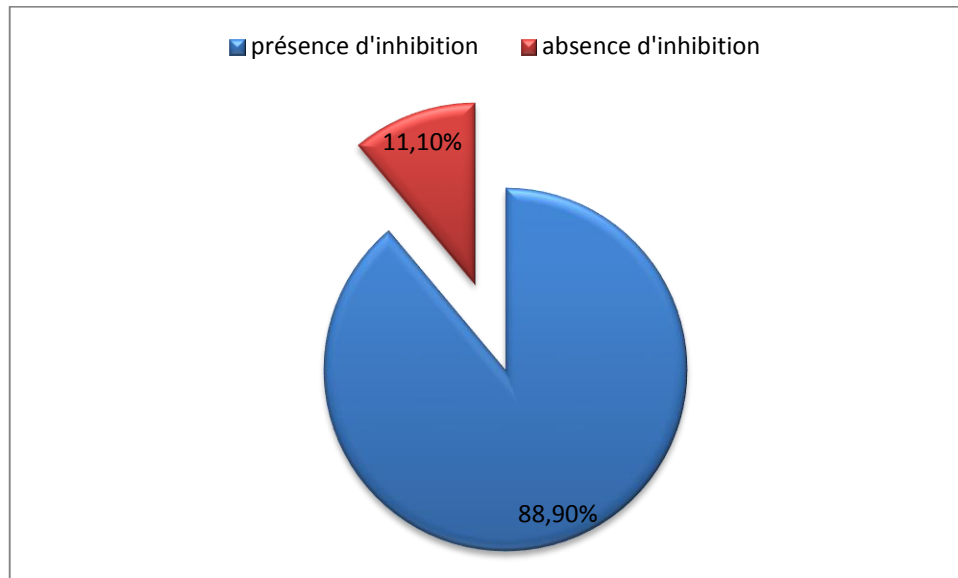


Figure 39 : Inhibitions des bactéries lactiques en milieu solide

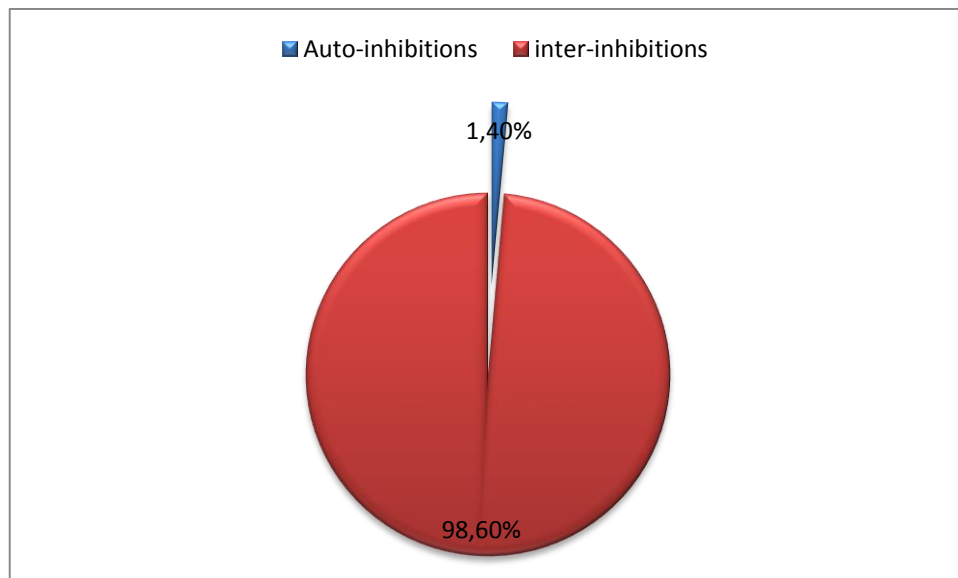


Figure 40 :Inter-inhibition et auto-inhibition des bactéries lactiques en milieu solide.

- ❖ Le taux des inhibitions exercés par les coques contre les isolats du genre *Lactobacillus* représente 27,9% avec un diamètre des halos compris entre 06 et 15mm.

- ❖ Le taux des inhibitions exercés par les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* contre les coques est de 21,40%.
- ❖ Les inhibitions exercées par les bactéries du genre *Pediococcus* contre les lactobacilles représentent un taux de 25,67% et dont le diamètre des halos d'inhibitions varie entre 06 et 15mm.
- ❖ Les inhibitions exercées par le genre *Lactobacillus* contre les bactéries du genre *Pediococcus* représentent un taux de 9,41% et dont le diamètre des halos d'inhibitions varie entre 05 et 17mm.
- ❖ Le taux des inhibitions exercés par les bactéries du genre *Lactobacillus* contre les isolats du genre *Enterococcus* et *Leuconostoc* est de 4,70%. Les diamètres des halos d'inhibitions varient entre 05 et 17mm pour *Enterococcus* et entre 06 et 09mm pour *Leuconostoc*.

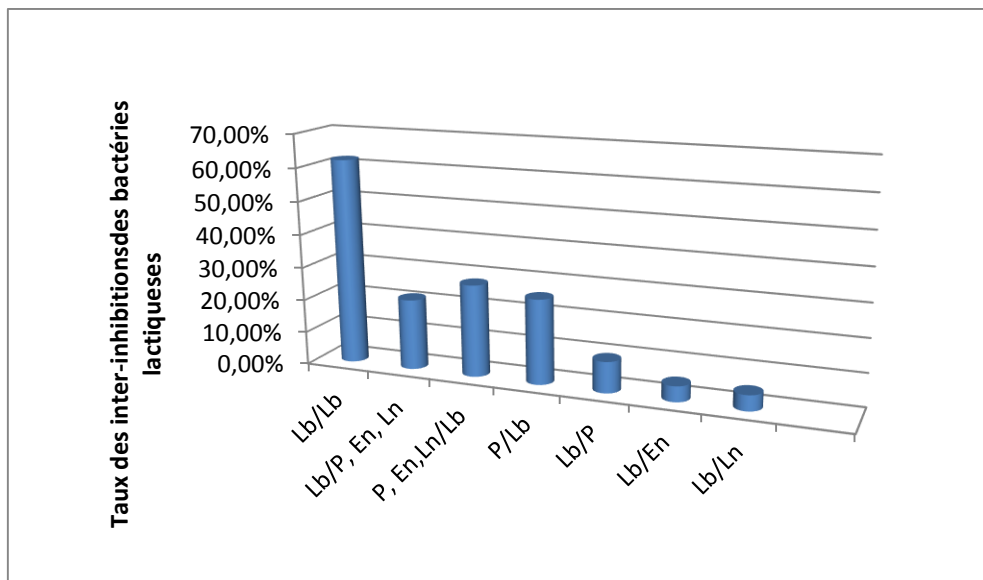


Figure 41: Taux des inhibitions inter-génériques des bactéries lactiques.

En : Enterococcus ; Lb : Lactobacillus ; Ln : Leuconostoc ; Pediococcus

- ❖ Parmi les coques inhibitrices des lactobacilles, 4 isolats se sont avérés sensibles aux lactobacilles (BHC4, BHC6 ; BHC10, BHC12).
- ❖ Parmi les coques sensibles aux lactobacilles, l'isolat BHL17 s'est avéré le plus sensible
- ❖ Les inhibitions exercées par les lactobacilles contre les lactobacilles sont plus importantes que celles exercées contre les coques.

D'après nos résultats, on remarque que les lactobacilles ont un spectre d'action élevé. En effet, ils sont connus pour leur pouvoir inhibiteur et acidifiant qui leur permet de résister à des pH inférieurs à 4 (Cocconcelli et Fontana, 2008).

La méthode de Fleming et *al.*, (1975) permet d'évaluer quantitativement le pouvoir inhibiteur des souches ensemencées en touches sur les souches ensemencées en masse dans la gélose. Elle met en évidence non seulement les inhibitions dues à la production d'agents inhibiteurs mais aussi celles dues au contact cellulaire.

Après avoir réalisé le criblage des antagonistes par cette méthode, nous avons retenus 7 isolats lactiques en tant que bactéries indicatrices et 14 isolats en tant que bactéries inhibitrices.

Le screening des isolats lactiques testés par la méthode de Fleming et *al.*, (1975) a montré un bon pouvoir inhibiteur (tableau 19, annexe 2). Parmi les 98 combinaisons testées, 92 ont révélé une inhibition, soit 94% de nos isolats ont un effet inhibiteur. Les zones d'inhibitions sont claires avec un contour bien distinct. Les figures 42 à 48 illustrent les inhibitions entre bactéries.

L'isolat BHL24 montre un effet étroit et le plus faible puisque les diamètres des halos d'inhibitions n'ont pas excédé 8mm. Toutefois, cet effet inhibiteur a été observé seulement contre les lactobacilles.

L'effet inhibiteur de la souche BHL27 s'est avéré large et en même temps plus marquant puisque dans plusieurs cas il a présenté les diamètres d'inhibitions les plus importants. D'une manière générale, nous pouvons conclure que les lactobacilles ont montré un effet inhibiteur qui est plus ou moins grand selon les indicatrices testées. Cet effet inhibiteur peut être causé par la production de composés antimicrobiens tels que les acides organiques, le diacétyl, le peroxyde d'hydrogène ou/et les bactériocines.

3.5.2. Inhibition par production d'acides organiques

Pour lever les inhibitions dues à la production d'acide lactique, nous avons utilisé un milieu tamponné à pH7. La comparaison des résultats obtenus en milieu tamponné et non tamponné va nous permettre de déterminer si la production d'acide lactique est le facteur déterminant des inhibitions enregistrées production de substances (H_2O_2 et/ou bactériocine).

D'après le résultat obtenu (figure 41), on remarque que 9,57% des inhibitions sont dues à la production d'acide lactique et 90,43% des inhibitions sont dues à la production de substances (H_2O_2 et/ou bactériocine).

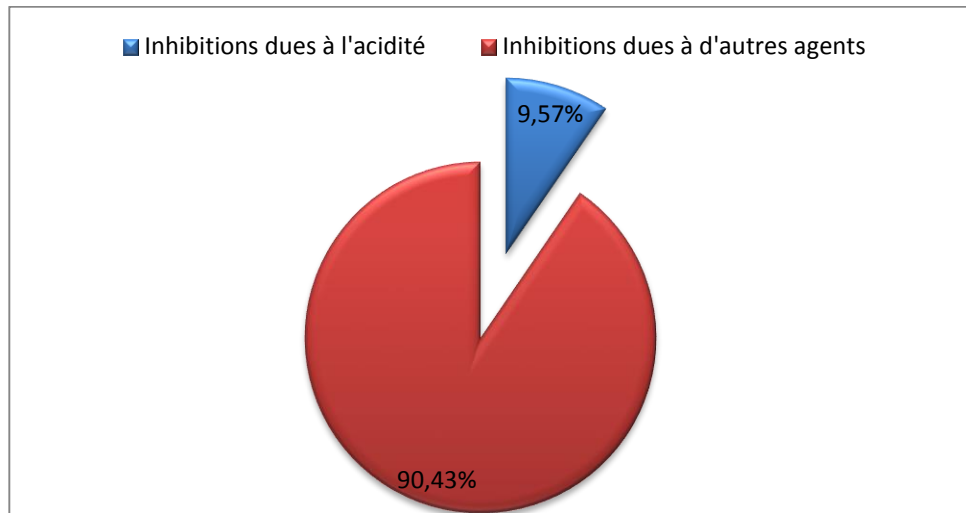


Figure 42 : Taux des inhibitions des isolats lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

L'emploi du milieu tamponné a permis de constater des levées d'inhibitions. En effet, on observe deux levées d'inhibitions chez les isolats BHC4, BHL11 et BHL25 alors que pour ceux de BHL8, BHL13 et BHL18 un seul cas est observé. Nous pouvons conclure que l'agent inhibiteur est l'acide lactique.

On a également observé une diminution des halos d'inhibitions indiquant la participation d'agents inhibiteurs (H_2O_2 , bactériocine) dans l'activité inhibitrice des bactéries testées. En effet, dans le cas de la souche BHL27 les diamètres des halos d'inhibitions ont diminués en milieu tamponné de manière significative.

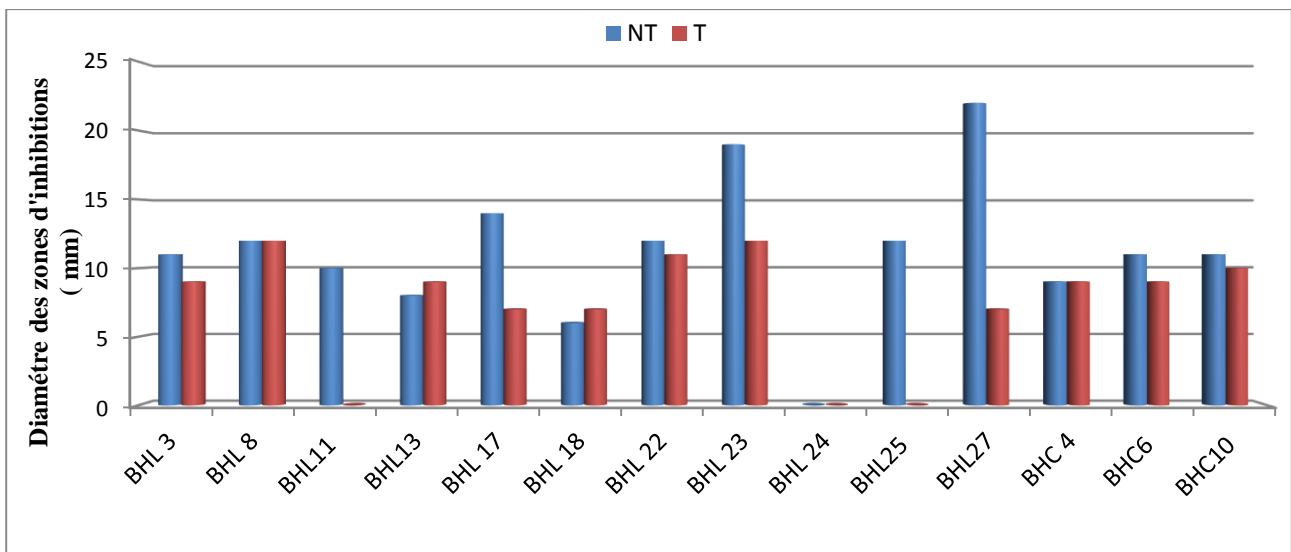


Figure 43 : Taux d'inhibition de BHC5 par les isolats lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

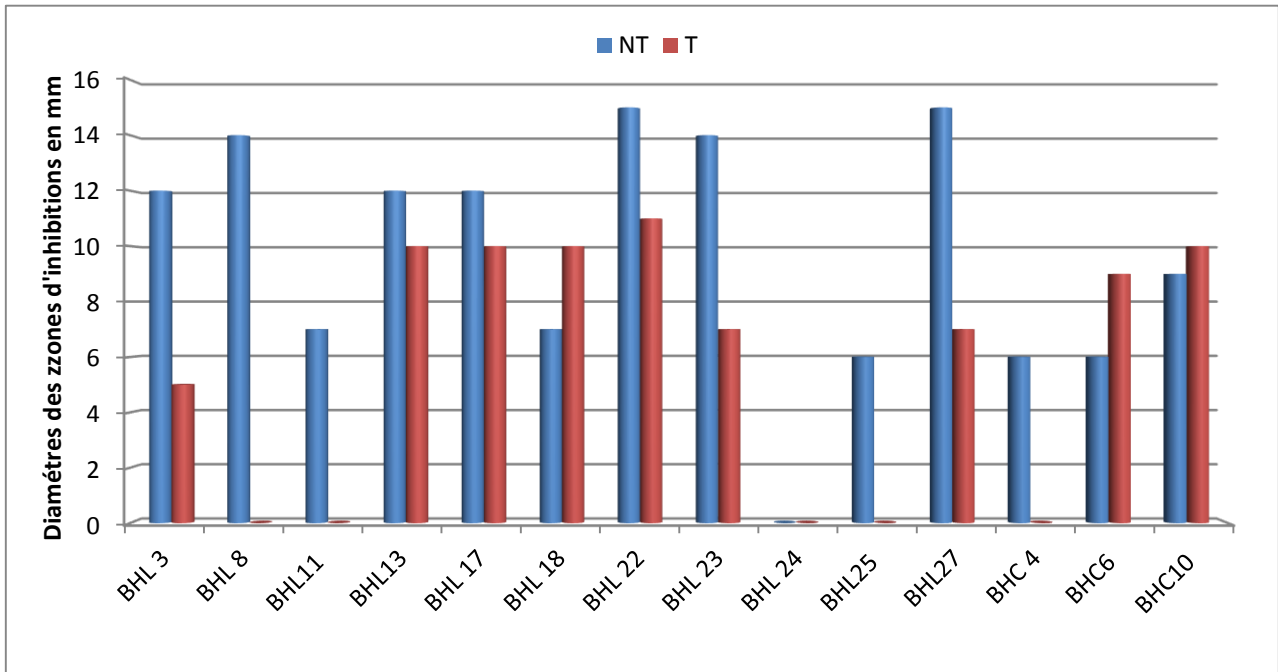


Figure 44: Taux d'inhibition de BHC4 par les isolats lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

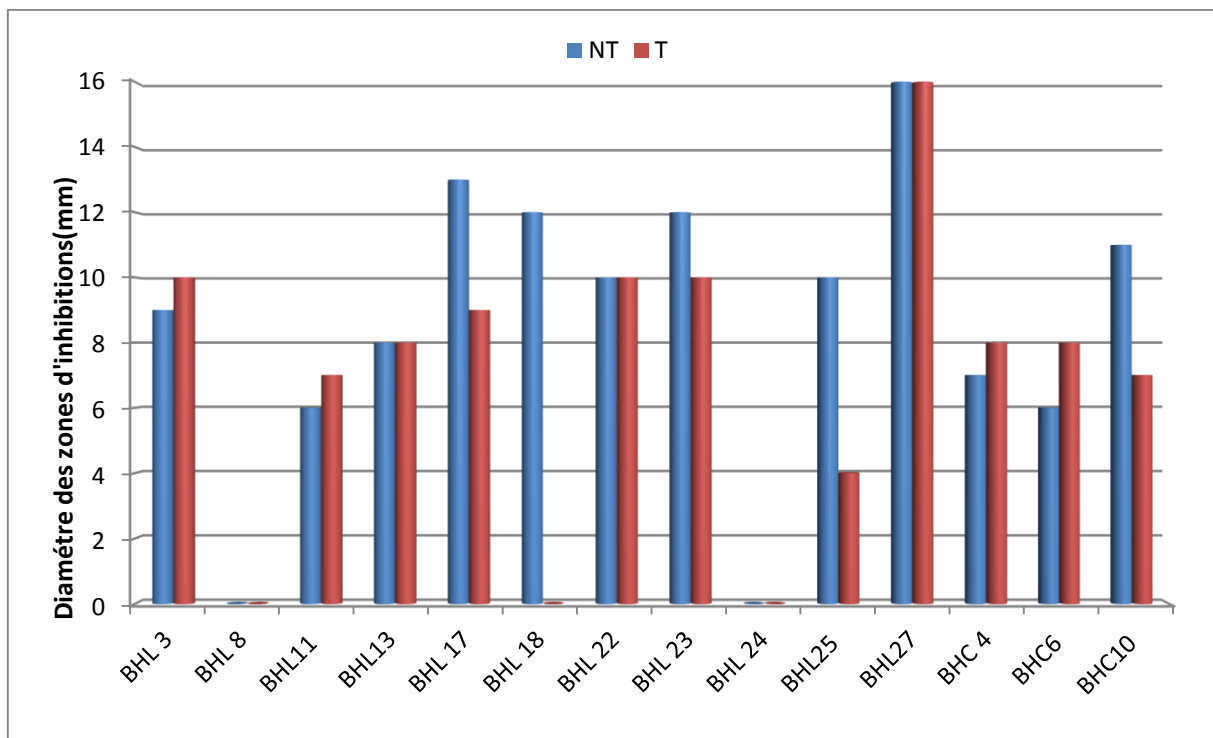


Figure 45 : Taux d'inhibition de BHL12 par les isolats lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

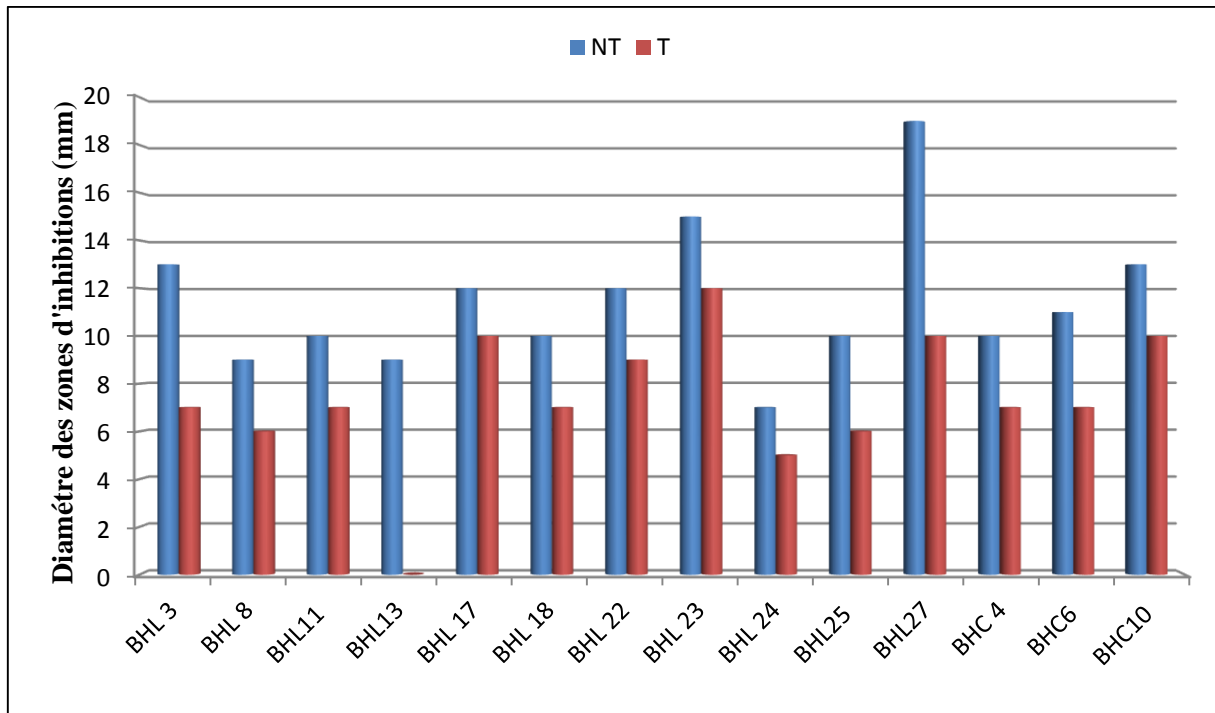


Figure 46 : Taux d'inhibition de BHL6 par les isolats lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

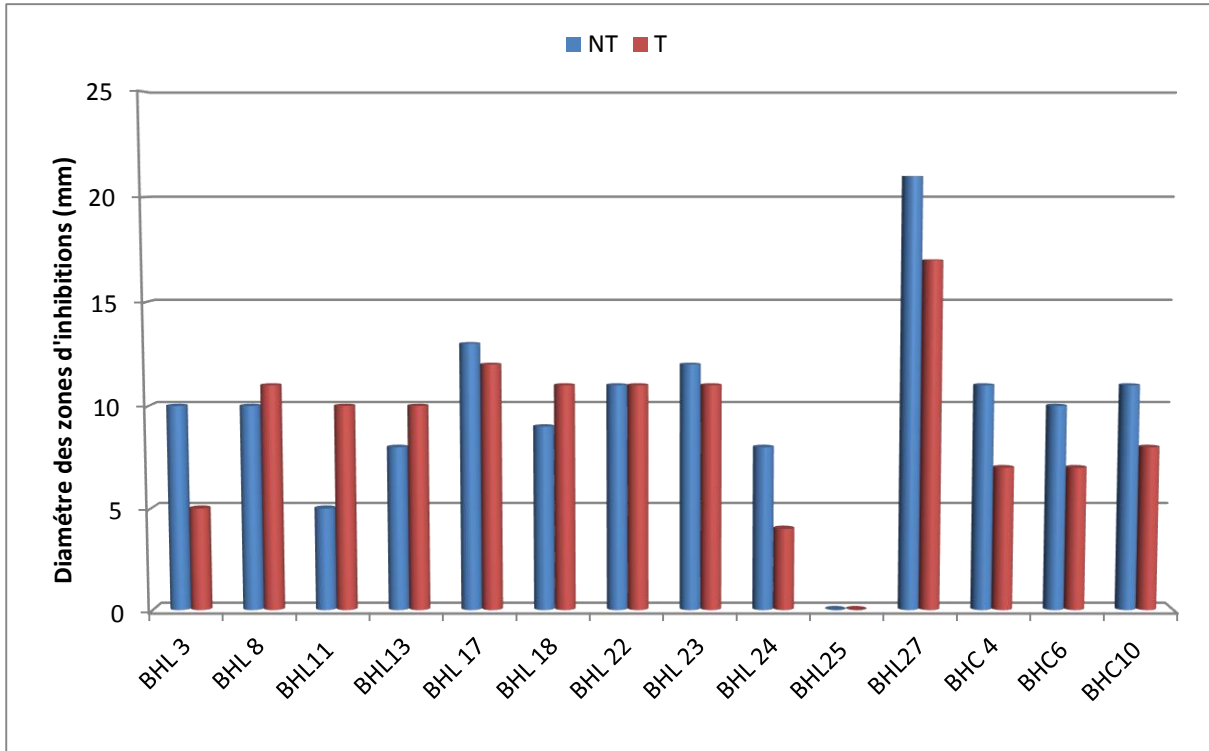


Figure 47 : Taux d'inhibition de BHL7 par les isolats lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

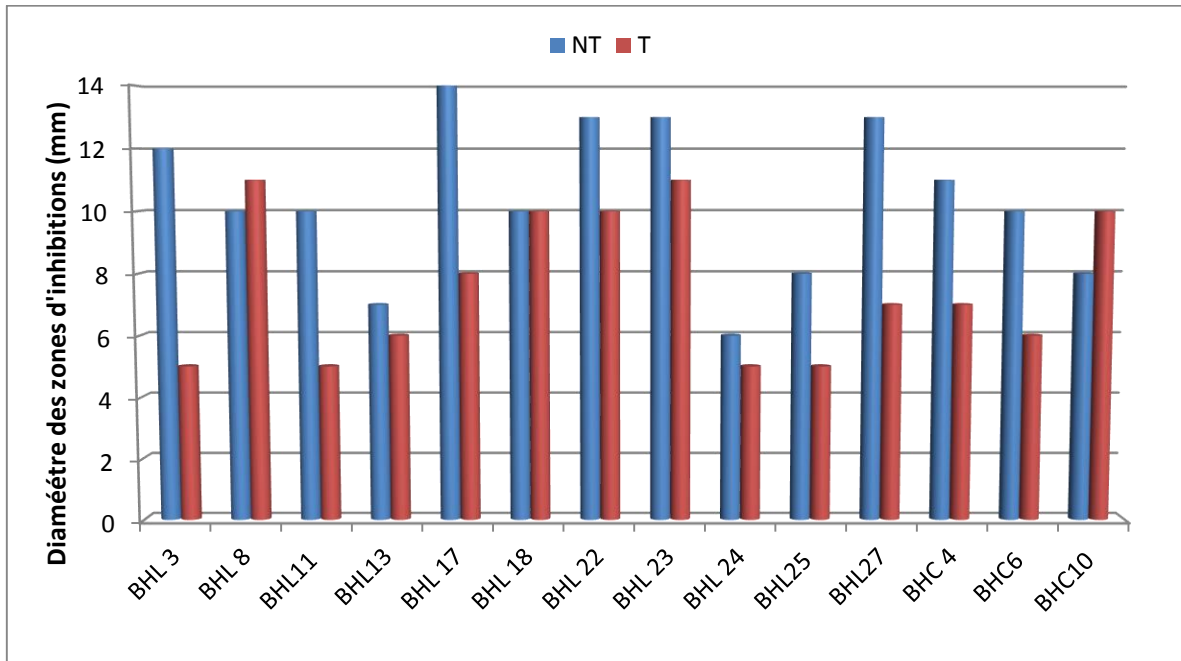


Figure 48 : Taux d'inhibition de l'isolat BHL9 par les bactéries lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

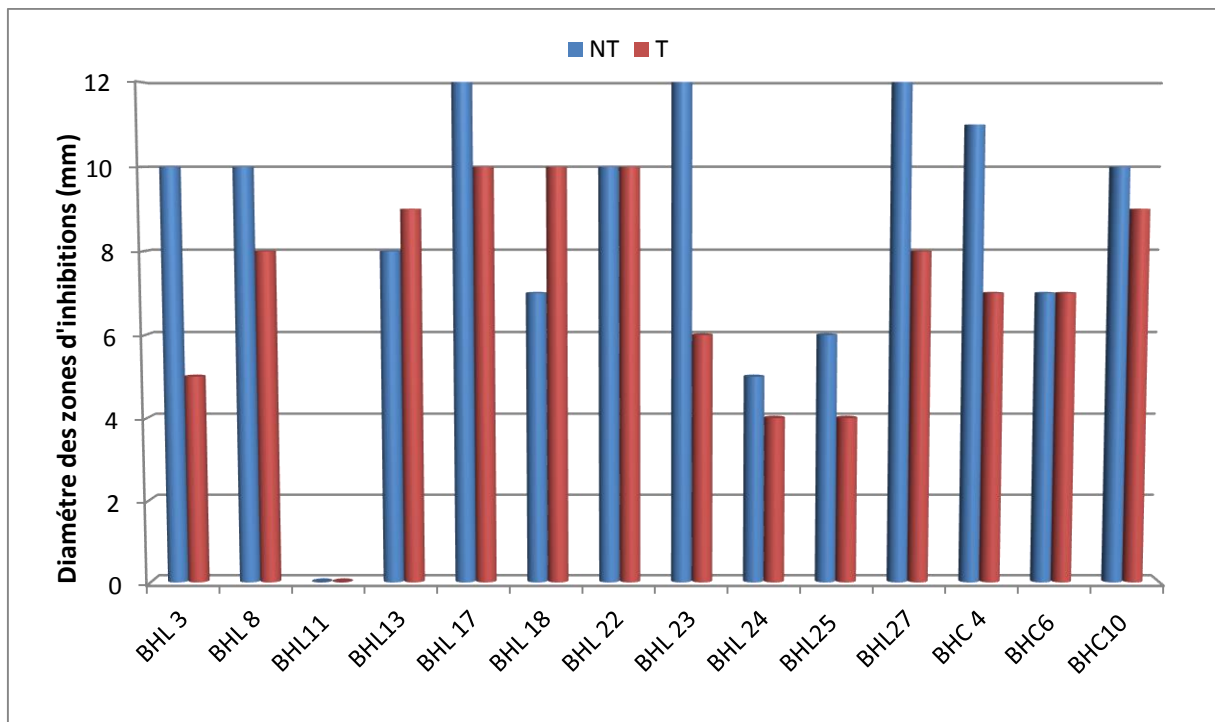


Figure 49: Taux d'inhibition de BHL21 par les isolats lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

Certaines interactions ont gardé le même effet inhibiteur en milieu tamponné et non tamponné, par exemple BHL8, BHL13, les inhibitions engendrées par ces souches ne sont pas dues aux acides organiques mais fort probablement au H₂O₂ ou à des bactériocines.

Les interactions dont les diamètres des halos d'inhibitions ont faiblement diminués par exemple, cas de BHL3 dont le halo d'inhibition en milieu non tamponné est de 11mm alors qu'il est de 9 mm en milieu tamponné. Dans ce cas, l'inhibition est due partiellement à l'acide lactique.

On remarque que selon l'indicatrice, la souche inhibitrice peut être inhibée par production d'acide lactique comme le cas de BHC4 ou par production d'agents inhibiteurs comme le cas de BHL18.

Dans certains cas, on constate que le diamètre de la zone d'inhibition en milieu tamponné augmente au lieu de diminuer, cela peut s'expliquer par l'amplification du milieu acide.

Cette étape nous a permis de distinguer nos bactéries ayant un fort pouvoir inhibiteur comme BHL27, BHL22, BHL23, BHL17, BHC10, BHL3 et BHL8 et celles qui ont été les moins inhibitrices comme BHL24 et BHL25. Tous les isolats se comportent comme de bonnes indicatrices.

3.5.3. Par la méthode des puits

Le test par la méthode de diffusion des puits a été réalisé pour vérifier si les inhibitions observées précédemment par la méthode de Fleming et *al.*, (1975) sont détectées par cette méthode. Les résultats enregistrés ont permis de constater une absence totale des zones d'inhibition malgré le nombre important de répétitions. Cette absence d'inhibition peut être accordée soit à une faiblesse de croissance bactérienne ou que le surnageant n'est pas trop concentré pour permettre de visualiser une inhibition (Dalache, 2006). Cette étude nous a permis de sélectionner un lot de bactéries lactiques performantes qui vont être soumis à une analyse protéomique afin d'apprécier les activités inhibitrices et probiotiques.

3.6. Mise en évidence des inhibitions des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques.

L'une des caractéristiques des bactéries lactiques est leur capacité à ralentir et/ou d'inhiber l'activité et la croissance des bactéries pathogènes et / ou d'altérations par la production d'agents inhibiteurs.

3.6.1. Mise en évidence des inhibitions par la méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983).

Les isolats pré-identifiés ont été testés par la méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983), pour la détection de souches lactiques productrices de substances protéiques antimicrobiennes. Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant des isolats avec les souches pathogènes indicatrices. L'activité inhibitrice se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits.

Les résultats enregistrés ont permis de constater une absence totale des zones d'inhibitions autour des puits malgré de nombreuses répétitions. Cette absence d'inhibition peut-être causée par une faible croissance bactérienne. Ces résultats rejoignent ceux d'Ammor et *al* (2005).

3.6.2. Mise en évidence des inhibitions par la méthode de Fleming et al. (1975).

Tous les isolats lactiques isolés à partir du hamoum ont été testés par la méthode de Fleming et *al*. (1975) et ont permis de sélectionner les bactéries productrices de substances antimicrobiennes. Ce criblage a été réalisé vis-à-vis des germes pathogènes à Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et à Gram négatif *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Cette activité inhibitrice se traduit par l'apparition d'un halo clair d'inhibition autour des isolats ensemencés en touches. Un exemple de résultats obtenus est représenté dans la figure 50.

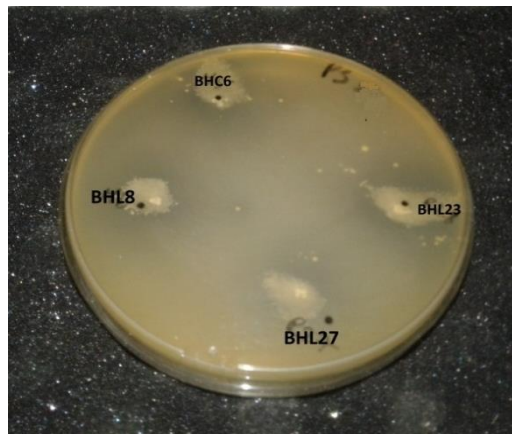


Figure 50 : Activité inhibitrice de 4 souches lactiques vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*.

La figure 51 montre les résultats des inhibitions des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques.

- ❖ On observe une activité inhibitrice chez 91,45% des isolats vis-à-vis des 3 souches indicatrices testées avec un diamètre du halo clair compris entre 5 et 24mm.
- ❖ 8,55% des isolats lactiques ne présentent pas d'inhibitions.

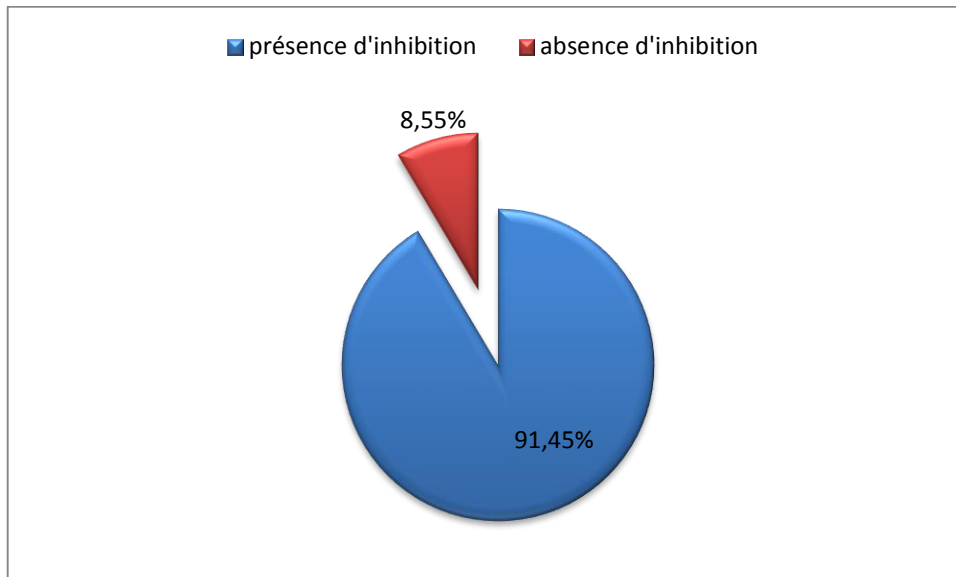


Figure 51 : Taux d'inhibitions des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques.

La répartition des isolats a été réalisée en fonction des diamètres des halos clairs. Selon Cardinal et *al.*(1977) et Tahiri (2007), les inhibitions dont les diamètres sont ≥ 10 mm sont considérées comme ayant un effet inhibiteur élevé.

- ❖ 9,34% des interactions présentent des inhibitions dont le diamètre est $<$ à 10mm et 90,66% des interactions dont le diamètre d'inhibition est \geq à 10mm.
- ❖ Les lactobacilles ont un spectre d'activité très large. Ils ont inhibé aussi bien les bactéries pathogènes à Gram positif qu'à Gram négatif avec des zones d'inhibitions qui atteignent 24 mm de diamètre traduisant ainsi un fort potentiel inhibiteur.
- ❖ Les bactéries à Gram positif ont été inhibées par toutes les bactéries lactiques testées.
- ❖ 82,05% des isolats inhibent *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; *Staphylococcus aureus* ATCC25923 est inhibés par 100% des isolats et *E.coli* ATCC 25922 est inhibé par 92,30% des isolats.

Ces inhibitions pourraient avoir plusieurs origines parmi lesquelles on peut citer : la production des composés antimicrobiens comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, les phages et/ou les bactériocines produits par les bactéries lactiques (Ammor et *al.*, 2006).

➤ Cause des inhibitions

Parmi les causes principales des inhibitions des bactéries lactiques, on a la production des acides organiques. Pour éliminer l'effet de ces acides sur les bactéries indicatrices, un milieu solide tamponné à pH7 est utilisé.

L'effet inhibiteur est testé selon la méthode de Fleming *et al.*, (1975), en utilisant du MRS solide tamponné et non tamponné comme témoin. La lecture des résultats consiste à comparer les zones d'inhibition obtenues dans les deux milieux. Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 52, 53, 54 et 55 ainsi que dans le tableau 20 (Annexe 2)

L'évaluation des résultats obtenus en milieu tamponné et non tamponné nous permet de faire les observations suivantes (Figure 52) :

- ❖ L'inhibition des bactéries lactiques a été levée dans 10,25% des cas.
- ❖ Les isolats lactiques dont les diamètres des zones d'inhibition ont diminué dans le milieu tamponné représentent 62,4% des cas.
- ❖ Dans certains cas, en milieu tamponné, les diamètres des zones d'inhibitions des isolats lactiques ont augmenté de 11,11% des cas.
- ❖ Le nombre des levées d'inhibitions est plus important chez les bactéries à Gram négatif.

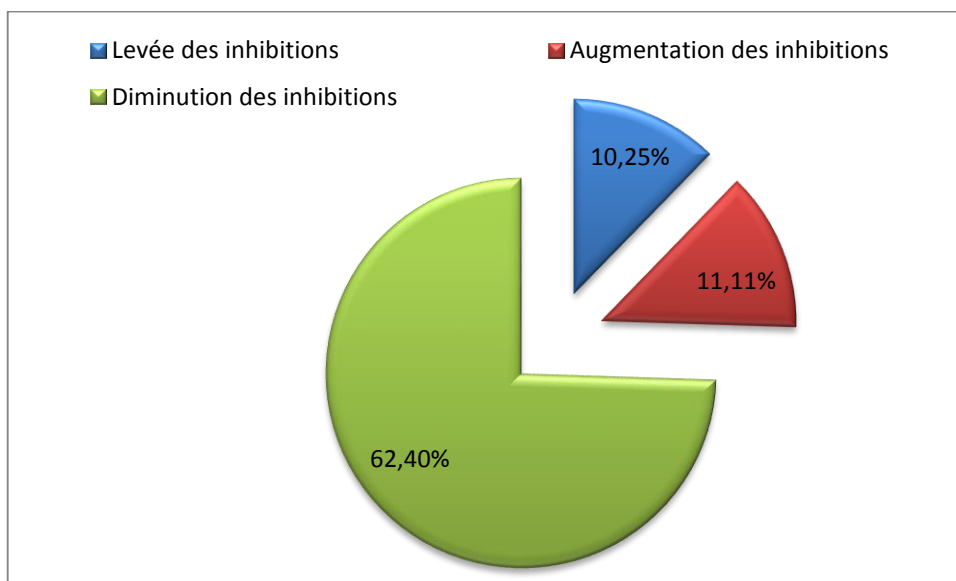


Figure 52 : Taux des inhibitions des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné(NT).

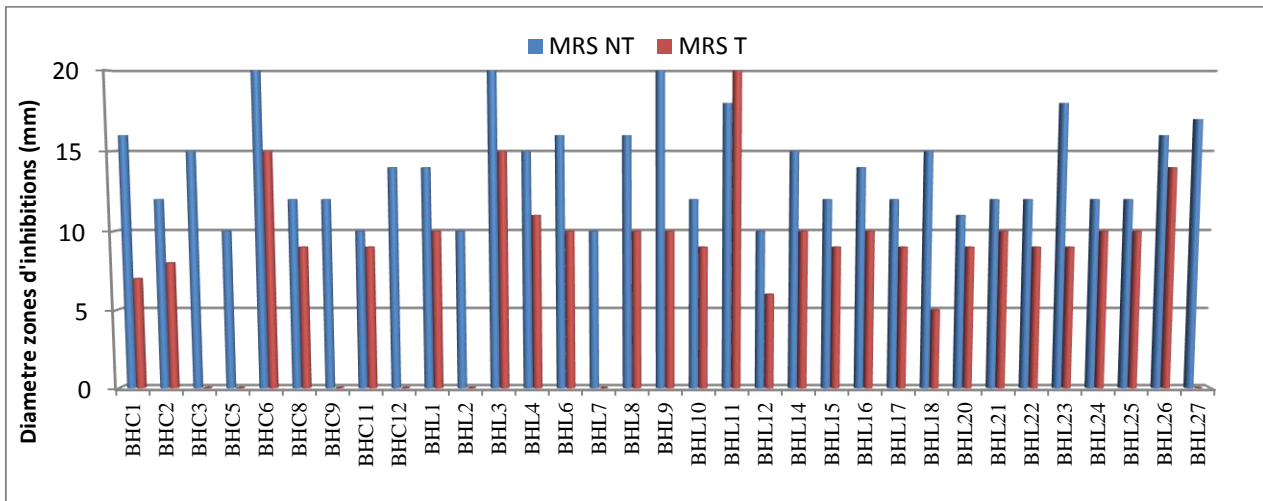


Figure 53 : Inhibition de la souche *E. coli* par les bactéries lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

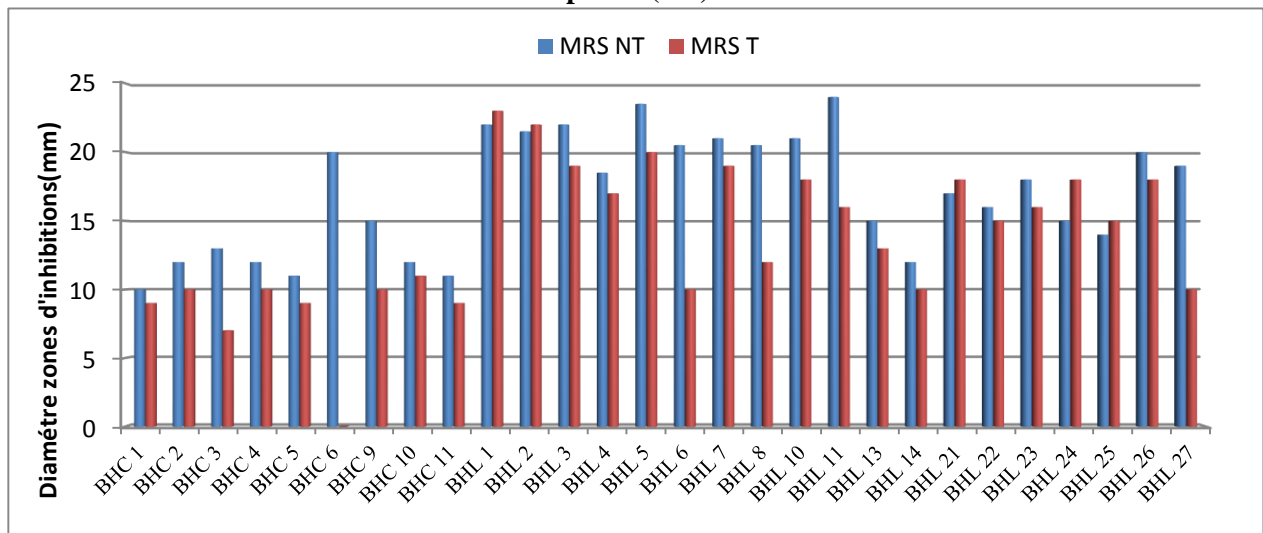


Figure 54 : Inhibition de la souche *Pseudomonas aeruginosa* par les bactéries lactiques en milieu tamponné(T) et non tamponné (NT).

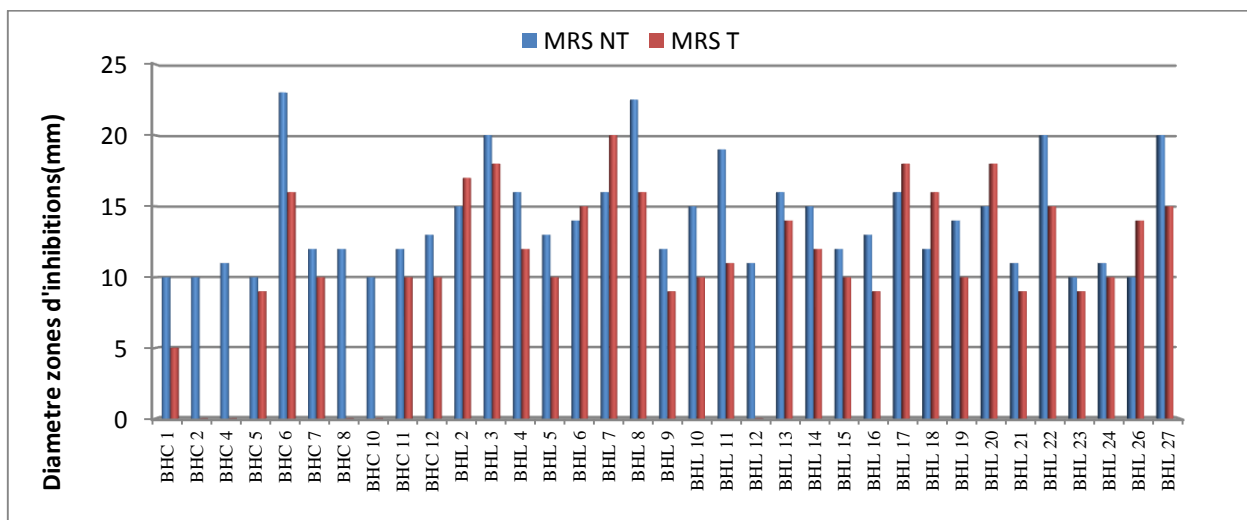


Figure 55 : Inhibition de la souche *Staphylococcus aureus* par les bactéries lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT)

Afin de sélectionner les bactéries bactériocinogènes parmi les 29 isolats soumis à l'activité antagoniste précédemment, nous avons choisi 15 isolats ayant montré un bon pouvoir inhibiteur. Ces isolats ont été traités par MALDI-TOF MS et 4 ont été identifiés. L'activité inhibitrice de ces 4 souches a été évaluée vis-à-vis des mêmes souches indicatrices, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et à Gram négatif indicatrices *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 56 et 57 et dans le tableau 21 en annexe 2.

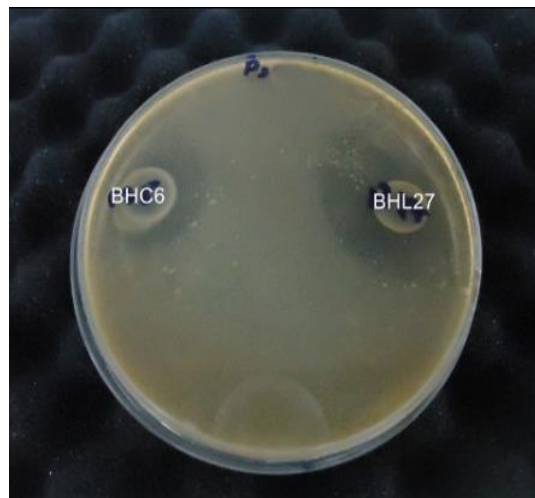


Figure 56 : Zones d'inhibition des souches BHC6 et BHL27 vis-à-vis de la souche *Pseudomonas aeruginosa*

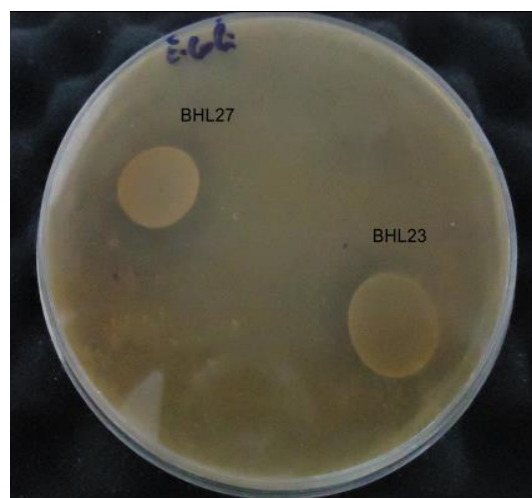


Figure 57 : Zones d'inhibition des souches BHL23 et BHL27 vis-à-vis d'*E. coli*.

On constate que les souches *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis* inhibent les bactéries pathogènes avec un diamètre qui varie de 10 à 23mm, cela traduit un fort potentiel inhibiteur. Ces effets inhibiteurs peuvent avoir plusieurs origines.

La première est la production d'acide organique, en effet, les lactobacilles sont connus pour leur grande résistance aux pH acides ((jusqu'à un pH voisin de 3,5) contrairement aux autres genres de bactéries lactiques qui sont plus sensibles (Podolak et al., 1996 ; Wilson et al., 2005).

La deuxième est que les souches lactiques produisent une substance inhibitrice de nature protéique (type bactériocine).

3.6.3. Mise en évidence de la nature de l'agent inhibiteur

3.6.3.1. Inhibitions en milieu tamponné

L'emploi d'un milieu tamponné permet de mettre en évidence les inhibitions dues à la production d'acide lactique (Figure 58 et 59).

- ✓ Une levée d'inhibition de la souche *Pediococcus acidilactici* (BHC6) vis-à-vis de *P.aeruginosa*.
- ✓ Une levée d'inhibition de la souche *Lactobacillus plantarum* (BHL27) vis-à-vis d'*E.coli*.

Les diamètres des zones d'inhibition des souches de *Lb.plantarum*, *Lb.brevis* et *P.acidilactici* ont diminué en milieu tamponné par rapport au milieu non tamponné.



Figure 58 : Effet inhibiteur des souches lactiques vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* en milieu tamponné.

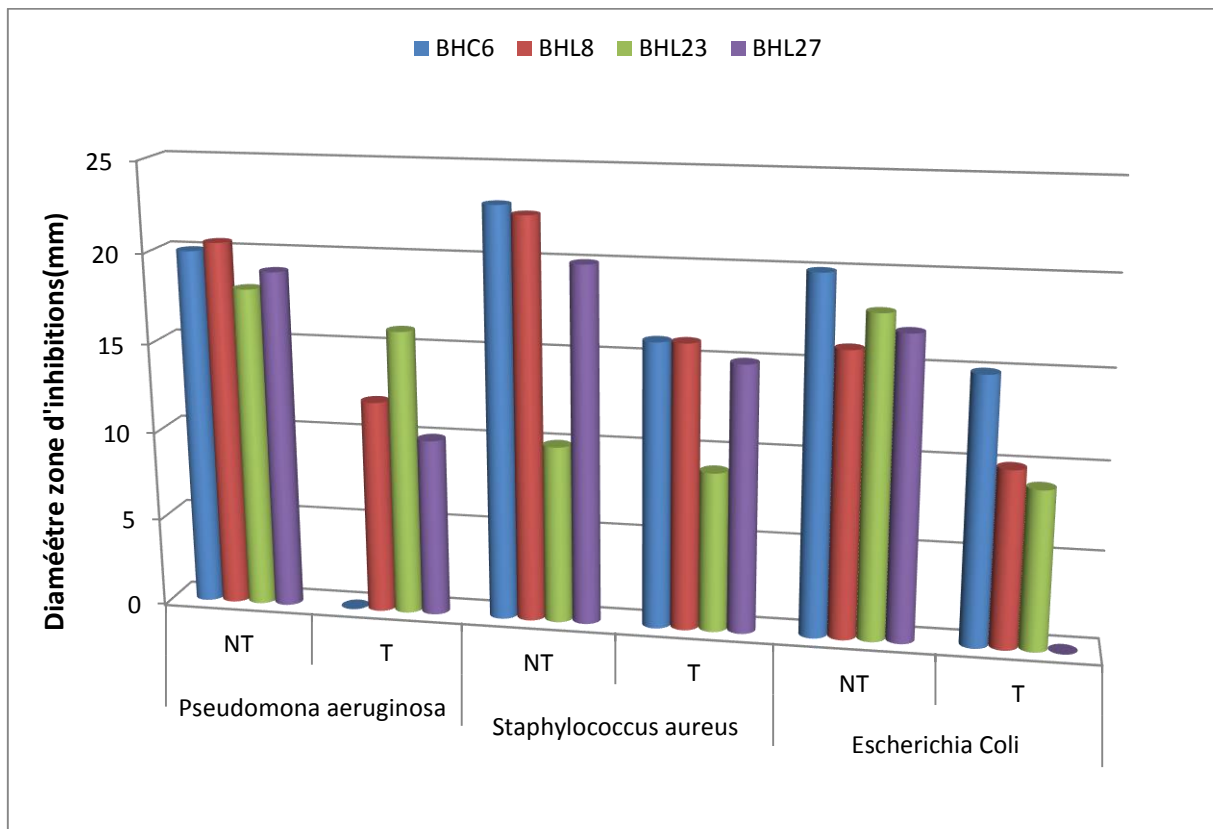


Figure 59 : Activités inhibitrices des 4 souches lactiques vis-à-vis des souches pathogènes testées en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

3.6.3.2. Inhibitions due au peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène sécrété par les bactéries lactiques peut être dégradé par l'enzyme catalase présente chez certaines espèces bactériennes. On constate que les souches BHL 27 (*Lactobacillus plantarum*), BHL 23 (*Lactobacillus plantarum*), BHL8 (*Lactobacillus brevis*) et BHC6 (*Pediococcus acidilactici*) sont actives en présence de l'enzyme. Cette activité s'est traduite par l'apparition de zones indiquant un autre facteur d'inhibition autre que le peroxyde d'hydrogène.

A ce stade de notre étude, la combinaison entre l'inhibition due à la production d'acide organique et le peroxyde d'hydrogène montre que pour les souches BHC6 et BHL27, l'inhibition est due à l'acidité uniquement, quant aux autres souches l'inhibition peut être due à un agent inhibiteur type bactériocine.

3.6.3.3. Inhibition due aux phages lysogènes

Le test des phages s'est révélé négatif pour l'ensemble des souches. Aucune plage de lyse n'est apparue indiquant que l'inhibition antimicrobienne était due à la lysogénie.

3.6.3.4. Inhibition due aux bactériocines

La production des substances antimicrobiennes type bactériocine est un facteur de l'activité inhibitrice des bactéries lactiques. Afin de déterminer la nature des agents inhibiteurs, les souches retenues (BHC6, BHL8, BHL23 et BHL27) ont été traitées par la méthode de Fleming et *al.*(1975 par deux enzymes protéolytiques (trypsine et α -chymotrypsine) préparées dans du tampon phosphate de sodium à pH7. Les résultats obtenus et représentés dans la figure 60 et le tableau 22 (Annexe 2) montrent une absence totale de la zone d'inhibition révélant ainsi que la substance inhibitrice est de nature protéique.

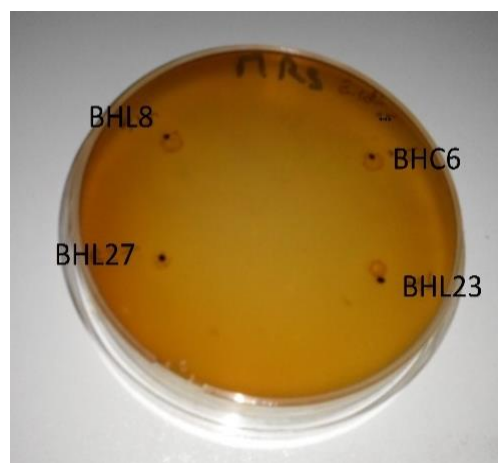


Figure 60 : Effets des différentes enzymes

Le traitement de nos souches à différentes températures permet de définir la classe à laquelle appartiennent les bactériocines.

Les surnageants soumis aux traitements thermiques 80°C et 100°C pendant 15 et 30mn n'ont pas résistés à ces températures. Aucune inhibition n'a été détectée indiquant que la bactériocine appartient à la classe III.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne de nos isolats lactiques a été étudiée par la méthode directe de Fleming et *al.*, (1975) contre des germes pathogènes ou/et d'altérations d'une part et d'autre part par la méthode indirecte afin d'évaluer l'effet des surnageants des cultures lactiques

Cette méthode a permis de réaliser un screening des bactéries antagonistes. Tous nos isolats testés contre les germes pathogènes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ont montrés des zones d'inhibitions importantes

indiquant un fort pouvoir inhibiteur. Cette activité inhibitrice est aussi bien dirigée contre les bactéries pathogènes à Gram positif qu'à Gram négatif.

D'après nos résultats, on constate que tous les isolats ont inhibés la croissance de *Staphylococcus aureus* à 100%. En revanche, plusieurs isolats appartenant à *Lactobacillus* (8) et aux coques(2) sont inactifs vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Les inhibitions pourraient être dues à la production des composés antimicrobiens (acide organiques, H₂O₂ et/ou bactériocines) produits par les bactéries lactiques (Ammoret *al.*, 2006).

Afin d'éliminer la possibilité d'un antagonisme vis-à-vis des bactéries pathogènes par la production d'acide organique, l'emploi d'un milieu de culture tamponné (tampon phosphate de sodium 0,1M, pH7) est testé selon la méthode de Fleming et *al.*, (1975). L'utilisation du milieu tamponné aide à stabiliser le pH et à éliminer l'effet de l'acidité dû à la production d'acide lactique (Labioui et *al.*, 2005). La comparaison des résultats entre le milieu tamponné et non tamponné indique des levées d'inhibitions dans 10,25% des cas.

Dans 62,4% des cas, les inhibitions persistent mais les diamètres des zones d'inhibitions diminuent. On remarque que l'activité antagoniste des bactéries lactiques contre les souches pathogènes est due essentiellement à la diminution du pH résultant de la production des acides organiques. Par ailleurs, dans certains cas (11,11%), en milieu tamponné, le diamètre d'inhibition augmente au lieu de diminuer. Par exemple, le cas d'*E.coli* inhibé par BHL24 dont le diamètre d'inhibition est de 15mm en milieu non tamponné augmente en milieu tamponné (18mm). Cela nous montre que l'acidité du milieu peut influencer sur le potentiel inhibiteur (Rossland et *al.*, 2005).

Pour la suite de notre travail, nous avons sélectionnés 15 isolats lactiques qui ont été soumis à une identification par MALDI-TOF MS. Quatre souches ont été identifiées comme suit : *Lactobacillus plantarum* codé BHL23 ; *Lactobacillus plantarum* codé BHL27 ; *Lactobacillus brevis* codé BHL8 et *Pediococcus acidilactici* codé BHC6. Nous avons étudié l'activité antagoniste de ces quatre souches lactiques par la méthode de Fleming et *al.*, (1975) vis-à-vis des trois bactéries pathogènes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Les résultats montrent que les cultures bactériennes de nos 4 souches lactiques possèdent un pouvoir inhibiteur important dont les diamètres d'inhibition varient de 10 à 23mm suivant les espèces pathogènes testées. La souche BHC6 possède le diamètre d'inhibition le plus important, car elle a inhibé la croissance de *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 23mm. En revanche, la souche BHL23 a montré une zone d'inhibition de 10mm. Nos souches présentent un fort potentiel

antagoniste contre les bactéries testées aussi bien à Gram positif qu'à Gram négatif. Ces bactéries pathogènes sont parmi les germes principalement impliqués dans les toxi-infections alimentaires et au cours de la fabrication des produits fermentés et de leur conservation. Les activités inhibitrices entre les isolats lactiques et les bactéries pathogènes nous ont permis de remarquer que les diamètres des zones d'inhibitions varient selon l'espèce (Prioult, 2003). Ces inhibitions peuvent être dues au pH, au milieu de croissance, à la production de substances antimicrobiennes comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines.

Les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique pendant leur croissance. Ce métabolite antibactérien modifie le pH du milieu et peut agir sur la croissance des bactéries cibles testées. Ces dernières sont des bactéries pathogènes ou d'altérations que l'on rencontre fréquemment dans les aliments tels que *Staphylococcus aureus* et *E.coli*. L'emploi d'un milieu tamponné révèle des levées d'inhibitions dans le cas de la souche *Lactobacillus plantarum* (BHL27) vis-à-vis d'*E.coli* et de *Pediococcus acidilactici* (BHC6) vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*. L'absence des inhibitions des souches BHC6 et BHL27 en milieu tamponné suggère que ces dernières sont dues à la production de l'acide lactique suite à l'abaissement du pH.

En effet, l'activité antibactérienne de l'acide lactique s'explique par la capacité à pénétrer sous sa forme non dissociée à travers la membrane cytoplasmique perturbant ainsi le maintien du potentiel de membrane et inhibant les systèmes membranaires de transport actifs (Alakomi *et al.*, 2007). De plus, Servin (2004) et Tejero-Sarinena *et al.* (2012), ont souligné que l'acide lactique agit comme un agent perméabilisant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Pour les autres souches, les halos d'inhibitions diminuent en milieu tamponné. Dans ce cas, on peut dire que l'inhibition est partiellement attribuée à l'acide lactique. Cette diminution du pH peut donc affecter la viabilité des pathogènes bactériens (Bruno et Shah, 2002 ; Servin, 2004). D'après DeVuyst *et al.* (1994), les bactéries lactiques sont capables de produire et d'excréter des substances inhibitrices autres que l'acide lactique ou l'acide acétique.

La multiplication de certaines cultures lactiques entraîne la production de peroxyde d'hydrogène considéré comme inhibiteur de la croissance bactérienne. (Juillard *et al.*, 1987). Le peroxyde d'hydrogène sécrété par les bactéries lactiques peut être toxique pour les bactéries lactiques. L'emploi de la catalase (élimination de l'effet du H_2O_2) a été actifs vis-à-vis des pathogènes testés. Ces résultats suggèrent la présence d'autres facteurs inhibiteurs. Ceci nous a conduits à vérifier la nature de l'agent inhibiteur type bactériocine. D'après Song et Richard, (1997), l'élimination de l'effet des acides organiques favorise plutôt l'activité antimicrobienne telle que celle des bactériocines.

La perte de l'activité antimicrobienne après traitement par les enzymes protéolytiques indique la sensibilité des composés actifs sécrétés par les souches à l'action des enzymes. Nos résultats suggèrent que les substances inhibitrices produites par nos souches sont de nature protéique. Le traitement thermique n'a révélé aucune activité résiduelle indiquant ainsi que les substances sécrétées sont sensibles à la chaleur. L'activité antagoniste des souches est due à une substance de nature protéique type bactériocine sensible à la chaleur.

Plusieurs facteurs peuvent avoir un effet sur l'activité antimicrobienne parmi lesquelles l'interaction entre la bactérie et les constituants cellulaires ou du milieu de croissance, de la pureté et de la croissance de l'enzyme et enfin de la technique employée pour détecter la sensibilité enzymatique (Ness et al., 1996).

Selon Klaenhammer (1988), trois critères sont indispensables pour qu'une substance antimicrobienne soit définie comme bactériocine : la présence d'une partie biologiquement active de nature protéique, un spectre d'activité inhibiteur étroit limité aux espèces taxonomiquement proches ou occupant la même niche écologique et un mode d'action bactéricide. Les substances antimicrobiennes produites par les souches bactériennes isolées du hamoum répondent aux critères retenus par Klaenhammer (1988), à savoir que nos souches possèdent une activité antimicrobienne qui est due à l'acidité et à un agent de nature protéique type bactériocine et sensibles à la chaleur. Les substances produites par nos souches appartiennent à la classe III.

Globalement, l'activité antimicrobienne élevée présente dans notre travail confirme les résultats de nombreux travaux indiquant les effets inhibiteurs de *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis* contre des germes pathogènes résistants aux antibiotiques appartenant à *E.coli*, *S.aureus* et *P. aeruginosa* (Benmechernene et al., 2013 ; Kermanshahiet al., 2014 et Chang et al., 2016). La production de bactériocine a également été rapporté chez *Lb.brevis* (Mohankumar et Murugalatha, 2011; Koo et al., 2015).

Messi et al. (2001), ont rapporté que la bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum*, plantaricine 35d a une forte action bactériocinogène contre *S.aureus* et *L.monocytogenes*. De même, Lash (2005) a décrit une bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 qui inhibait *S.aureus*, *E. coli*, *L.innocua* et *P.aeruginosa*). Millette et al. (2007), ont identifié une bactériocine produite par *P.acidilactici* MM33.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres auteurs qui ont montré que les bactéries à effet probiotique sont capables d'empêcher la croissance des bactéries pathogènes *in vivo* et *in vitro* (Lin et al., 2007; Mahdhi et al., 2010b). La recherche de bactériocines s'avère

intéressante pour remplacer les conservateurs qui sont des produits chimiques de synthèse. Cependant, ces derniers ne sont pas sans risques pour la santé. En effet, les aliments doivent être surs, nutritionnellement équilibrés, pratiques à utiliser, avoir bon goût, etc. mais ils sont sujets à la détérioration causée, entre autres, par des microorganismes (bactéries, moisissures, levures). Les bactéries productrices de substances inhibitrices s'avèrent les candidats les mieux placés pour préserver les aliments d'une part, et d'autre part pour la réduction des intoxications alimentaires dues aux bactéries nuisibles. Ces propriétés peuvent se réaliser par l'exploitation des potentialités des bactéries lactiques capables de produire diverses substances dotées de propriétés antimicrobiennes.

3.7. Etude du potentiel probiotique des souches lactiques

La survie des bactéries lactiques aux conditions du tube digestif représente un critère de sélection des souches probiotiques. C'est la raison pour laquelle nous avons testé ces deux paramètres afin de vérifier si nos souches seraient de bons candidats probiotiques.

3.7.1. Tolérance à l'acidité

La résistance à l'acidité est l'une des caractéristiques recherchées lors de la sélection des bactéries probiotiques. Elle est basée sur la survie des bactéries comptées principalement par dénombrement sur milieux gélosés après exposition simulant les conditions gastriques. Les résultats obtenus ont été calculés selon l'équation suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \log \text{UFC à } T_{(3h)} / \log \text{UFC } T_{(0h)} * 100$$

L'ensemble des souches a donné une bonne résistance aux conditions acides (Figure 61).

A pH 2,5, seule la souche *Lactobacillus brevis* (BHL8) présente un taux de survie de 63,6% par rapport aux souches *Lactobacillus plantarum* (BHL27, BHL23) dont les valeurs sont respectivement de 99,41% et 98%. La souche *Pediococcus acidilactici* (BHC6) a atteint un pourcentage de 92,33%.

A pH 4,5 qui représente le pH de l'estomac au moment ou juste après le repas, la souche *L. plantarum* (BHL23) présente un taux de survie supérieur à 100%. A ce même pH, les taux de croissance ont augmenté de 16,41% pour la souche BHL8, de 0,12% pour BHC6, 6,06% pour BHL23 et 0,79% pour BHL27.

A pH 6,5, les souches BHL23 et BHL27 ont montré une grande proportion de cellules viables malgré une légère diminution. Les souches BHL8 et BHC6 présentent une augmentation non négligeable de leur taux de survie.

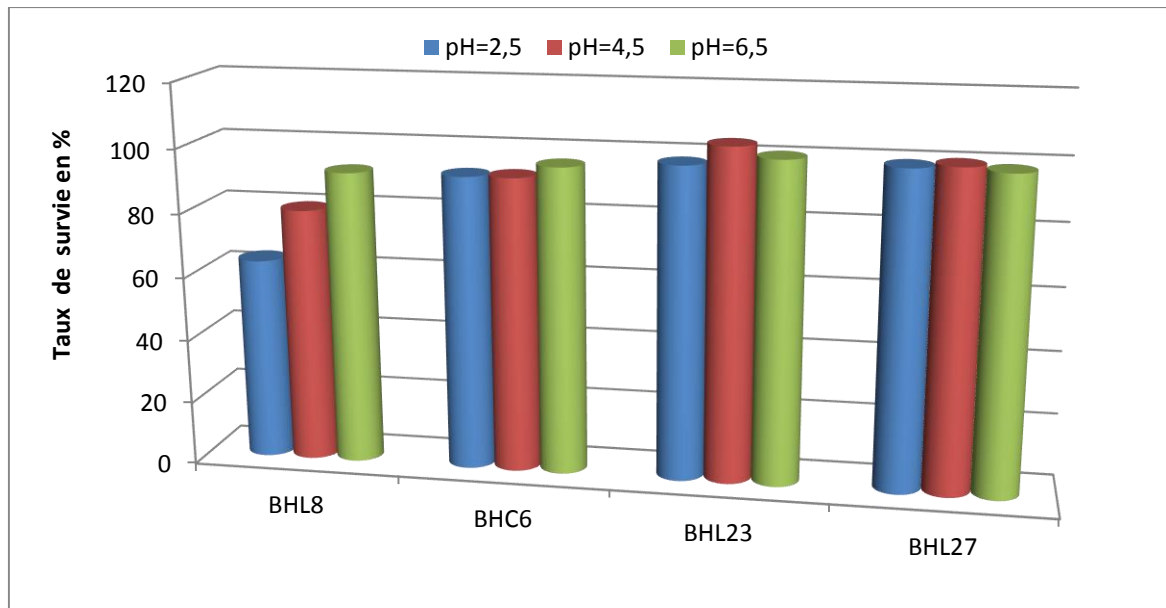


Figure 61 : Tolérance à l'acidité des souches lactiques

3.7.2. Tolérance aux sels biliaries

La résistance aux sels biliaries a été évaluée *in vitro* avec des cultures en présence de différentes concentrations en sels biliaries (0,3%, 0,5% et 1%) dans du milieu MRS. La technique utilisée est la même que pour la résistance à l'acidité. Les résultats ont été calculés selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \log \text{UFC à } T_{(3h)} / \log \text{UFC } T_{(0h)} * 100$$

D'après les résultats obtenus (Figure 62), on constate que toutes les souches montrent une viabilité élevée en présence de toutes les concentrations testées en sels biliaries.

A pH 2,5 et 0,3% de sels biliaries, le taux de survie est sensiblement le même pour les souches BHL8 et BHC6 par rapport au témoin, excepté la souche BHL27 qui montre une résistance qui dépasse les 100%. La souche BHL23 montre une légère augmentation de la résistance aux sels biliaries par rapport aux souches BHL8 et BHC6.

A pH 2,5 et 0,5%, le taux de survie des souches BHL8 et BHC6 est pratiquement le même par rapport à celui observé à 0,3% et aux témoins. En revanche, la souche BHL23 enregistre un taux

de résistance bas par rapport au témoin et aux autres souches. La souche BHL27 possède le taux de résistance le plus important.

A pH 6,5 et 0,3% de sels biliaries, les souches BHL8 et BHL27 possèdent les mêmes taux de résistance et s'alignent sur les taux témoins. Les souches BHL23 et BHL27 enregistrent également un taux important de croissance des cellules.

A pH 6,5 et 0,5% de sels biliaries, les souches BHL8 et BHL27 ont des taux de résistance sensiblement identiques aux témoins. Le taux de résistance de la souche BHC6 est très important par rapport à l'ensemble des souches et au témoin. Par ailleurs, la souche BHL23 possède une bonne croissance.

A pH 2,5 et 1% de sels biliaries, la viabilité des cellules bactériennes a sensiblement baissé chez la souche BHL8. Néanmoins, on remarque une certaine stabilité des taux de survie des souches BHL23 et BHC6. La croissance en présence de sels biliaries de la souche BHL27 est supérieure par rapport au témoins sans sels biliaries.

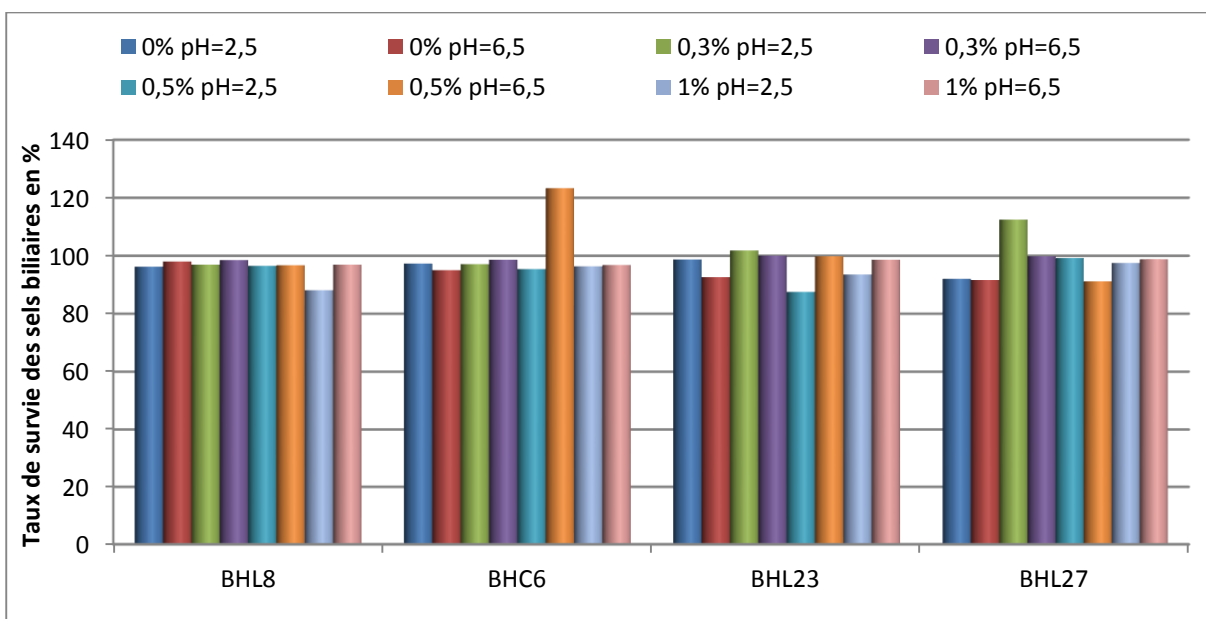


Figure 62 : Tolérance des sels biliaries des souches lactiques.

A pH 6,5 et 1% en sels biliaries, toutes les souches présentent une croissance stable durant les 3h d'incubation.

Les résultats montrent que les souches lactiques ont une capacité assez importante à croître dans des concentrations élevées en sels biliaries.

L'étude de la survie des bactéries lactiques dans le tractus gastro-intestinal est important pour une meilleure connaissance du devenir des bactéries lactiques ingérées avec l'aliment et une meilleure compréhension de l'action des probiotiques chez l'homme et l'animal. Pour exercer un effet probiotique significatif, les bactéries doivent arriver vivantes et en nombre suffisant dans l'intestin (Drouault et Corthier., 2001). En effet, pour que la flore lactique puisse atteindre vivante le gros intestin, il faut franchir certaines barrières telles que l'acidité gastrique, le pouvoir bactéricide des sels biliaries etc.

Le critère essentiel dans la sélection d'un microorganisme potentiel probiotique est sa capacité d'atteindre, de survivre dans le tractus digestif et notamment aux pH acides et aux sels biliaries. C'est la raison pour laquelle nous avons testés ces deux paramètres afin de vérifier si nos souches seraient de bons candidats probiotiques.

Globalement, toutes les souches bactériennes du hamoum présentent une bonne viabilité aux pH acides pendant les 3h d'incubation, cette durée reflète la durée moyenne du temps passé par les aliments dans l'estomac (Argyryet *al.*, 2013). Ceci suggère qu'elles ont la capacité de traverser l'acidité stomacale et peuvent atteindre facilement le milieu intestinal où elles pourraient s'y multiplier.

D'après nos résultats, Il apparaît que la résistance à l'acidité des quatre espèces bactériennes étudiées varie selon la souche et le pH. En effet, on remarque que *Lactobacillus plantarum* est la souche la plus résistante aux conditions gastriques, ce qui est en adéquation avec les résultats d'étude portant sur cette espèce (Hamon et *al.*, 2011). Quant à *Lactobacillus brevis*, celle-ci présente une bonne tolérance à l'acidité, mais elle reste néanmoins en dessous de celle de *Lb. plantarum* qui dans l'ensemble dépasse les 100% après 3h d'incubation. Selon Hartke et *al.*(1996) et Takahashi *et al.*(2004), la résistance à l'acidité n'est pas acquise suite à une diminution du pH mais elle est souche dépendante.

De même, la plupart des bactéries lactiques comme les lactobacilles et les streptocoques sont naturellement bien adaptés à un pH acide, elles sont capables non seulement de produire des acides mais de fonctionner à pH acide. Nos résultats montrent également que les pediococques et en particulier l'espèce *P. acidilactici* possèdent un taux de survie élevé de 96.2%, ceux-ci sont en accord avec ceux trouvés par Millette *et al.*, (2007). La survie à pH3, après 2 à 4h d'incubation est considérée comme le seuil optimal pour les souches probiotiques (Chou et Weimer, 1999).

Des études ont montrées que les lactobacilles d'origine animale ou alimentaire ont la capacité de conserver leur viabilité à des pH compris entre 2,5 et 4,0 (Maragkoudakis et *al.*, 2006 ;

Xanthopoulos et *al.*, 2000). D'après nos résultats, on peut dire que nos souches lactiques isolées du hamoum *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* et *Pediococcus acidilactici* pourraient être de bons candidats probiotiques.

Cependant, ce type de test est largement utilisé pour le criblage de souches à potentiel probiotique mais il présente une certaine limite. Ainsi, le dénombrement par culture sur gélose ne détermine que les cellules cultivables et sous-estime le nombre réel de cellules vivantes. Cependant, malgré cette limite, les études comparatives comme réalisées ici nous donnent une idée préliminaire de la résistance relative des souches aux conditions gastriques.

La tolérance à la bile est l'une des caractéristiques recherchées lors de la sélection des bactéries probiotiques. Les bactéries doivent transiter via le duodénum en plus grand nombre de cellules viables pour atteindre le site d'action et se multiplier. A ce niveau, certains composants de la bile, notamment les acides biliaires comme l'acide cholique compromettent la viabilité des bactéries ingérées.

La capacité de survie peut être modifiée par la présence de la bile qui peut provoquer un stress chez les cellules sensibles. Contrairement, à l'acidité qui s'estompe après le passage gastrique, l'action de la bile persiste plus longtemps (Singhal et *al.*, 2010). Ainsi, après leur passage dans l'estomac les bactéries sont confrontées, à l'action délétère des sels biliaires. Ils constituent une barrière à franchir par les bactéries probiotiques pour gagner leur site d'action.

Les résultats obtenus pour le test de la tolérance aux sels biliaires, montrent que toutes les souches sont capables, non seulement de survivre dans le milieu MRS solide additionné de la solution de sels biliaires mais peuvent aussi y croître. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Bouzaine et *al.* (2004) qui ont montré une tolérance et une croissance de certaines souches de *Lactobacillus sp* sur le milieu MRS-agar additionné de la solution d'Oxgall à 0,3%. Nous avons noté cependant, que le suc biliaire exercerait un effet variable sur la croissance des différentes souches testées.

Globalement, les souches de *L. plantarum* se sont révélées légèrement plus tolérantes aux sels biliaires par rapport à *L. brevis*. Cette tendance rappelle celle obtenue pour la résistance à l'acidité, ce qui suggère des capacités relatives analogues pour les souches à lutter contre les deux stress environnementaux.

Selon Gowri et Ghost, (2010), le taux normal de sels biliaires dans l'intestin est d'environ 0.3%. A cette concentration, toutes les souches testées se sont révélées tolérantes aux sels biliaires. On remarque, néanmoins que l'augmentation de la concentration de la bile s'accompagne d'une

légère diminution du taux de croissance des cellules à pH 2,5. Cette résistance des lactobacilles aux sels biliaires est due au fait que la bile joue un rôle majeur dans l'émulsification des lipides et facilite ainsi leur digestion. Elle est également capable d'affecter l'intégrité cellulaire des bactéries en agissant sur leur membrane plasmique (Begley et al., 2005).

Pour survivre aux effets délétères de la bile, les bactéries lactiques possèdent des hydrolases de sels biliaires (BSH) qui aident à hydrolyser la bile conjuguée et lesquels ont par ailleurs été suggérées comme étant des marqueurs spécifiques témoignant d'une adaptation à la niche intestinale (O'Sullivan et al., 2009).

Ces enzymes sont indispensables à la tolérance à la bile chez *Lb. plantarum* et *Lb. Salivarius* (Fang et al., 2009; Lambert et al., 2008). Par ailleurs, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus plantarum* sont capables de percevoir la présence de bile dans leur environnement et de répondre en induisant la synthèse de protéines de surface (Bron et al., 2004; Bron et al., 2006; Pfeiler et Klaenhammer., 2009).

Selon Usmann (1999), la survie des souches probiotiques à pH 3,0 et à une concentration de 0,1% de sels biliaires après 2h d'incubation est considérée comme une tolérance optimale. En comparaison avec nos résultats, on constate que nos souches sont très performantes à la tolérance des sels biliaires puisque toutes les souches ont résisté aux concentrations de 0,1% de sels biliaires après 3h d'incubation. La résistance à l'acidité et la croissance en présence de la bile des souches suivent la même tendance, elles montrent une meilleure survie en milieu acide et de bonnes croissances en présence de bile.

On remarque que les deux paramètres testés suivent la même corrélation. En effet, les souches possèdent un comportement similaire face à l'acidité et la bile. Ceci est dû aux caractéristiques des souches qui leur confèrent une bonne croissance en présence de la bile et une bonne tolérance à l'acidité.

Cependant, une étude utilisant un criblage génétique pour estimer le potentiel probiotique a été effectuée au sein d'une collection de bactéries isolées de différents aliments fermentés. Celle-ci a montré la présence d'un équipement génétique favorable à la survie du passage du tractus digestif puisque plus de 90% d'entre-elles possèdent 7 des 12 gènes impliqués dans la résistance à pH acide et possèdent 7 des 9 gènes impliqués dans la survie aux sels biliaires. Toutefois, cette distribution des gènes impliqués dans la survie est très variable (Turpin, 2011).

3.7.3. Détermination des profils de résistance des antibiotiques des souches de bactéries lactiques.

La résistance aux antibiotiques a été réalisée pour nos quatre souches lactiques vis-à-vis de onze antibiotiques. Ces derniers appartiennent à différentes familles dont les β -lactamines (l'amoxicilline **AX**, l'amoxicilline +l'acide clavulanique **AMC** ; la fosfomycine **FOS**, et la céfalotine**CF**), les aminosides (la gentamycine **CN** et la néomycine **NE**) ; les macrolides (l'érythromycine **E** et la pristinamycine **PT**) ; les tétracyclines (**TE**) et les fluoroquinolones (l'ofloxacin**OFX**et la ciprofloxacine **CIP**). La mesure du diamètre des zones d'inhibitions de chaque souche pour chacun des antibiotiques testés permet de définir les souches comme étant résistantes ou sensibles.Nous avons considérés que le diamètre de 15mm est la limite entre la résistance et la sensibilité (Karam et Karam, 1994) donc toutes nos souches qui ont un diamètre inférieur à 15mm sont considérées comme étant des souches résistantes et celles qui possèdent un diamètre supérieur à 15mm sont considérées comme sensibles.

Les résultats obtenus de l'antibiogramme sont regroupés dans le tableau 25 et illustrés dans les figures 63 à 67.

Tableau25 : Antibiogramme des souches lactiques

Familles des antibiotiques				Souches lactiques testées			
	ATB	Symbole	Charge (μ g)	BHL27	BHL23	BHL8	BHC6
β -lactamines	Amoxicilline	AX	25	R	R	S	R
	Amoxicilline+Acide clavulanique	AMC	20+10	R	R	S	R
	Céphalotine	CF	30	R	R	R	R
	Fosfomycine	FOS	30	R	R	R	R
Aminosides	Gentamycine	CN	10	R	R	R	R
	Néomycine	NE	30	R	R	S	R
Macrolides	Erythromycine	E	15	R	R	S	R
	Pristinamycine	PT	15	R	R	S	R
Tétracycline	Tétracycline	TE	30	R	R	S	R
Fluoroquinolones	Ofloxacin	OFX	5	R	R	S	R
	Ciprofloxacine	CIP	5	R	R	S	R

Les bactéries lactiques sont d'une utilisation sûre dans les aliments fermentés, car elles sont présentes dans le tractus gastro-intestinal humain, et elles sont aussi intentionnellement ajoutées à

l'alimentation. Des préoccupations ont été soulevées quant à la résistance aux antibiotiques chez ces bactéries bénéfiques. Les antibiotiques sont des substances antimicrobiennes d'origine biologique ou synthétique, utilisées comme médicaments pour empêcher la multiplication ou la destruction des bactéries. La résistance bactérienne aux antibiotiques est naturelle mais peut-être acquise chez certaines souches devenant résistantes après modifications de leur équipement génétique chromosomique ou plasmidique.

Le développement de l'industrie des probiotiques constitue une des voies les plus importantes pour la propagation des gènes de résistance entraînant ainsi une augmentation des résistances multiples aux antibiotiques (Ammor et *al.*, 2008 ; Darsanaki et *al.*, 2013).

L'examen de l'antibiogramme permet de constater que *Lactobacillus brevis* présente une sensibilité aux familles des β – lactamines représentées par l'amoxicilline, et l'amoxicilline + l'acide clavulanique ; aux macrolides représentés par l'érythromycine, pristinamycine ; aux cyclines représentées par la tétracycline et aux familles des fluoroquinolones représentées par l'ofloxacin, ciprofloxacine.

La souche *Lactobacillus brevis* est sensible à huit antibiotiques sur onze testés. Ce résultat est en accord avec des études ayant rapportées que les lactobacilles sont généralement sensibles aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines comme le chloramphénicol, l'érythromycine, et les tétracyclines (Temmerman et *al.*, 2003 ; Coppola et *al.*, 2005 ; D'aimmo et *al.*, 2007) et aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne telle que les β -lactamines comme l'ampicilline, la pénicilline et l'oxacilline (Charteris et *al.*, 1998b ; Ammor et *al.*, 2007 ; Khöll et *al.*, 2008).

En ce qui concerne les deux souches de *Lactobacillus plantarum*, elles ont présenté une résistance vis-à-vis des 11 antibiotiques.



Figures 63& 64: Antibiogramme de la souche BHL8.



Figure 65 : Antibiogramme de la souche BHC6.

Figure 66 : Antibiogramme de la souche BHL23.

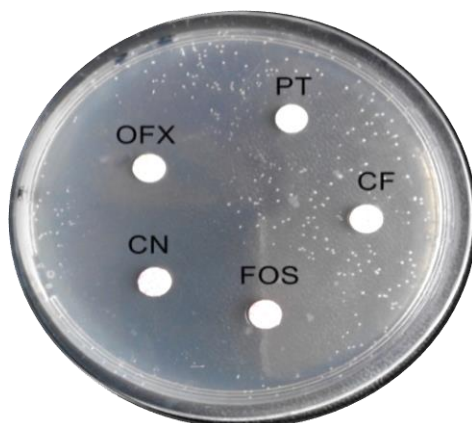


Figure 67 : Antibiogramme de la souche BHL27

Les Lactobacilles sont résistants à la famille des β -lactamines et en particulier aux céphalosporines de la première génération. Cette résistance a été démontrée dans des études publiées (Swenson et *al.*, 1990 ;Charteris et *al.*, 1998b ; Delgado et *al.*, 2005 ; Florez et *al.*, 2005) et présente un caractère intrinsèque (Coppola et *al.*, 2005, Ammor et *al.*, 2008).

En effet, l'utilisation anarchique des antibiotiques depuis un certain temps en particulier les β -lactamines a conduit à l'émergence de souches résistantes. Les gènes de résistance vis-à-vis de ces antibiotiques sont souvent localisés sur des éléments mobiles facilement transférables entre les bactéries même d'espèces différentes (Diallo et *al.*, 2013).

Toutes nos souches excepté BHL8 sont résistantes aux antibiotiques appartenant à la famille des aminosides (gentamycine et néomycine) et aux macrolides (érythromycine et pristinamycine) et aux fluoroquinolones (ciprofloxacine, l'ofloxacine) et aux tétracyclines. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Coppola et *al* (2005) et Herreros et *al* (2005) pour les aminosides ; par Klare et *al* (2007) et Belletti et *al* (2009), Toomey et *al* (2010) pour les macrolides ; par Kastner et *al* (2006) et Ouaba et *al* (2008) pour les fluoroquinolones.

Les lactobacilles ont également une résistance intrinsèque à des inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques comme le triméthoprim et les sulfamides (Charteris et *al.*, 1998 ; Katla et *al.*, 2001 ; Ammor et *al.*, 2008).

Les lactobacilles sont connus pour leur résistance aux aminosides (Charteris et *al.*, 1998b ; Coppola et *al.*, 2005 ; Zhou et *al.*, 2005), celle-ci est intrinsèque et est attribuée à l'absence de transport d'électron du cytochrome-médiation permettant l'absorption d'antibiotiques (Charteris et *al.*, 2001). La résistance à la tétracycline est souvent attribuée à des plasmides ou à des transposons chez de nombreuses espèces bactériennes.

La résistance de *Lactobacillus plantarum* (Ammor et *al.*, 2008 ; Casodo Munoz et *al.*, 2014) et *Lactobacillus brevis* (Fukao et *al.*, 2012) aux antibiotiques s'est révélée principalement intrinsèque et portée par des gènes chromosomiques non transférables entre les bactéries.

L'espèce *Pediococcus acidilactici* résiste à tous les antibiotiques testés. De nombreux auteurs ont obtenus des résultats de résistance semblables pour (i) les β -lactamines (Swenson et *al.*, 1990 ; O'Connor et *al.*, 2007 ; Ammor et *al.*, 2008) ;(ii) les macrolides (O'Connor et *al.* ; 2007 ; Ammor et *al.*, 2007) ; (iii) à la tétracycline (Swenson et *al.*, 1990 ; Toomey et *al.*, 2010).

L'hétérogénéité des profils de résistance des souches lactiques peut-être due au genre auquel appartient la bactérie, à l'état physiologique et à la nature des antibiotiques. En effet, les phases et les vitesses de croissance des cellules peuvent entraîner des variations de résistance aux antibiotiques (Dhar et McKinney, 2007). Par exemple, les β -lactamines sont actives seulement sur les bactéries en croissance (Walsh, 2003). Cette résistance peut également avoir lieu par l'imperméabilité de la paroi cellulaire et aussi, il se peut que la bactérie testée possède le gène de résistance (Devirgili et *al.*, 2008). Enfin, le milieu de culture joue également un rôle dans la résistance aux antibiotiques ; en effet Ammor et *al.* (2007) ont rapporté que le milieu MRS peut inactiver certains antibiotiques.

Les bactéries lactiques utilisées comme probiotiques ont le potentiel de servir d'hôte de gènes de résistance aux antibiotiques, ce qui augmente le risque de transmettre ces gènes aux bactéries pathogènes de l'homme (Ammor et Mayo, 2007). C'est pour cela que les souches ayant un potentiel probiotiques devraient être sélectionnées de la flore commensale de l'homme ou de l'animal et ne devraient pas transporter de manière intrinsèque des caractères de résistance aux antibiotiques. Cette résistance aux antibiotiques des souches ayant les critères probiotiques devrait être rigoureusement évaluée afin de minimiser le risque de transfert horizontal.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Actuellement, il existe un intérêt majeur pour l'amélioration de la qualité et de la sécurité alimentaire par conséquent la demande des consommateurs pour les produits les moins transformés et sans agents chimiques de conservation est en constante recrudescence.

Le « Hamoum » est un blé fermenté par la technique traditionnelle due au stockage souterrain « Matmora ». Ce produit constitue un produit terroir que nos aînés utilisaient pour leur consommation.

Au cours de ce travail, nous avons commencé notre étude par une identification phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du « Hamoum ». A partir de 122 isolats prélevés à partir des échantillons de blé fermenté, nous avons sélectionné 39 bactéries lactiques. Cette identification classique a été réalisée à l'aide d'une étude morphologique, biochimique et physiologique et elle nous a permis d'orienter nos bactéries vers 4 principaux genres : *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Leuconostoc*.

La distribution quantitative a permis de caractériser 27 bacilles et 12 coques. Parmi les lactobacilles, 11 appartiennent à l'espèce *Lactobacillus plantarum*, 8 représentent l'espèce *Lactobacillus amylophilus*, 3 appartiennent à l'espèce *Lactobacillus brevis* et 5 sont représentatifs de l'espèce *Lactobacillus casei*. Les coques sont représentés par 4 espèces *Pediococcus acidilactici* et 2 *Pediococcus pentosaceus*, 3 *Leuconostoc mesenteroides* sp *mesenteroides* et 3 *Enterococcus faecium*. Cette distribution montre une diversité de la flore lactique dont *Lactobacillus plantarum* est l'espèce dominante.

L'étude des interactions entre bactéries lactiques, mise en évidence par la méthode de Fleming et al., (1975) a montré 88,90% d'inhibitions et 11,10% d'absence d'inhibition. Les inhibitions inter-géniques enregistrent un taux de 98,60%. Toutefois, nous remarquons que les inhibitions exercées par les lactobacilles contre les lactobacilles sont plus importantes à celles exercées contre les coques. Après ce screening, nous avons retenus 7 isolats lactiques en tant que bactéries indicatrices et 14 isolats en tant que bactéries inhibitrices. Les résultats de ces interactions ont montré que les lactobacilles possèdent un effet inhibiteur non négligeable selon les indicatrices testées. L'emploi du milieu tamponné a permis de détecter les inhibitions dues à l'acidité dont le taux est de 11,34% et celles dues à la production de substances (H_2O_2 et/ou bactériocine) est de 88,66%. Cette étape nous a permis de différencier nos bactéries ayant un fort pouvoir inhibiteur

comme BHL27, BHL22, BHL23, BHL17, BHC10, BHL3 et BHL8 et celles qui ont été les moins inhibitrices comme BHL24 et BHL25.

L'activité inhibitrice des isolats lactiques vis-à-vis des 3 souches pathogènes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 97853 par la méthode de Fleming et *al.*, (1975)) a montré que 91,45% des isolats du blé fermenté possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis de bactéries cibles à Gram+ et à Gram-. Parmi ces bactéries, nous avons retenus 90,66% des isolats ayant un diamètre des halos > à 10mm. Un taux de 62,4 % des inhibitions dues à la diminution des diamètres des halos a été déterminé par l'emploi d'un milieu tamponné. En revanche, aucune activité inhibitrice n'a été constatée par la méthode indirecte (Barefoot et Klaenhammer 1983).

Quatre souches ont subi une identification protéomique par MALDI-TOF MS avec de bons scores. Les spectres et les pics générés ont permis de les identifier au rang de genre et d'espèce. Il s'agit de : 2 souches appartenant à l'espèce *Lactobacillus plantarum* (BHL23, BHL27), 1 souche à *Lactobacillus brevis* (BHL8) et 1 souche à *Pediococcus acidilactici* (BHC6).

L'activité antimicrobienne des 4 souches lactiques identifiées par MALDI-TOF MS a été étudiée vis-à-vis des 3 souches pathogènes suivant la méthode de Fleming et *al* (1975). Les souches lactiques ont montrés un large spectre d'inhibition vis-à-vis des germes pathogènes. L'utilisation d'un milieu tamponné a permis de constater des levées d'inhibitions de *Lactobacillus plantarum* (BHL27) vis-à-vis d'*E.coli* et de *Pediococcus acidilactici* vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*.

En ce qui concerne les autres souches, nous avons observé une diminution de l'activité antibactérienne. Les inhibitions dues à la production de peroxyde d'hydrogène, mise en évidence par traitement à la catalase sont présentes chez les 4 souches. La caractérisation de la nature de l'agent inhibiteur a été réalisée par le traitement avec des enzymes protéolytiques (trypsine et α -chymotrypsine). L'absence d'inhibition nous permet de conclure que les inhibitions produites par nos 4 souches vis-à-vis des bactéries pathogènes sont dues à la production de substance type bactériocine.

La tolérance à l'acidité pH (2,5 ; 4,5 et 6,5) et aux sels biliaires (0.3%, 0.5% et 1%) des 4 souches a été mise en évidence selon la méthode d'Hydrominus et *al* (2000). Les résultats fournis par l'étude *in vitro* des aptitudes probiotiques ont montré une résistance remarquable à l'égard des conditions hostiles testées.

Les profils de résistance aux antibiotiques ont montré que les souches *Lb.plantarum* et *P. acidilactici* possèdent une polyrésistance aux antibiotiques testés excepté *Lb. brevis* qui est sensible

aux ATB appartenant aux familles des macrolides, des aminosides sauf la gentamycine, des β -lactamines sauf la céphalotine et la fosfomycine, des tétracyclines et des fluoroquinolones.

Les souches étudiées présentent *in vitro* des propriétés probiotiques intéressantes telle que le pouvoir antibactérien, la production de substances type bactériocine et enfin la tolérance aux stress acide et aux sels biliaires.

Toutefois, cette étude est un point de départ pour approfondir et caractériser les propriétés biotechnologiques des bactéries lactiques du blé fermenté. De plus, ces informations pourraient être utilisées dans l'élaboration d'un programme de recherche afin d'identifier et de sélectionner des souches probiotiques à des fins thérapeutiques.

Ces résultats offrent des perspectives et peuvent être complétés par

- La purification des bactériocines ;
- l'étude des propriétés de ces bactériocines ;
- Elargir la gamme des souches pathogènes testées ;
- Compléter l'étude probiotique (hydrophobicité, adhésion aux cellules).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques:

A

Abee T., Krockel L., Hill C. (1995) - Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J. Food. Microbiol* : 28: pp 169- 85.

Abriouel, H., Omar, NB., Lopez, R.L., Martinez-Canamero, L., Keleke M.S.,and. Galvez, A. (2006). Culture-independent analysis of the microbial composition of the African traditional fermented foods poto poto and dégué by using three different DNA extraction methods. *International Journal of Food Microbiology* 111: 228–233.

Adams, M.R. et Hall, C.J. (1988). Growth inhibition of food borne pathogen by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food.Sci. Technol.*23:287—292.

Adebolu, T.T., Olodun, A.O and. IhunwezeB.C. (2007). Evaluation of ogi liquor from different grains for antibacterial activities against some common diarrhoeal bacteria in Southwest Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 6: 1140–1143.

Ait-Belgnaoui A., lamine F., han W., eutamene H., fioramonti J., bueno L. ET theodorou V.(2005). A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. *Nutr. Ali. Fonct.* 3: 59-63.

Alakomi, H.L., Skytta, E., Saarela, M.,Mattila-Sandholm,M.T., Katva-Kala, K., and. Helander,I.M. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane.*Appl. Environ. Microbiol.* 66 (5): 2001-2005.

Albano, H., Todorov, S.D., VanReenen, C.A. and Hogg, T. (2007). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from “Alheuras (Traditional Portuguese Fermented Sausages). *Elsevier* (76), 4:796-800.

Alfonso, A., G. Ventimiglia, O. Corona, R. Di Gerlando, R. Gaglio, N. Francesca, G. Moschetti and L. Settani, (2013). Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours. *Food Microbiology* 36,343-354.

- Ali, A.A., (2010). Beneficial Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Human Health: A review. *Research journal of microbiology* 5, 1213-1221
- Allison, G. E., Fremaux, C., and Klaenhammer, T. R. (1994) Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J Bacteriol.*176: 2235-2241
- Alonso-Calleja, C., Carbello, J., Capita, R., Bernarda, A. et Garcia- Lopez, M.L.(2002). Changes in the microflora of Valdetja raw goats milk cheese throughout manufacturing and ripening. *Lebensmittel-wissenschaft Und-Technology.*
- Alves V.F., Martinez R.C.R., Lavrador M.A.S. & De Martinis E.C.P.(2006). Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. *Meat Sci.*, 74(4), 623-627.
- Ammor, S., Rachman, C.A., Chaillou, S., Prevost, H., Dousset, X., Zagorec, M., et Chevallier, I. (2005). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food. Microbiology*, 22:373-382.
- Arena, M.E. et Manca de Nadra, M.C. (2001). Biogenic amine production by *Lactobacillus* *Journal of Applied Microbiology*, 90: 158-162.
- Ammor, S., Tauveron,G., Duffour, E., and Chevallier,I. (2006). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same small- scale facility producing traditional dry sausages: 1- Sreening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17 (6), pp. 454-461.
- Ammor, M.S. et Mayo B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science.* 76: 138-146.
- Ammor, M.S., Florez, A.B. et Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food.Microbiol.*24:559-570.
- Ammor, S., Florez, A.B., Van Hoek, A.H.A.M., De Los Reyes-Gavilan, C.G., Aarts Henk, J.M., Margolles, A. et Mayo, B. (2008). Molecular characterization of intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *J. Mol. Microbiol Biotechnol*, 14:6-15

Altena, K., Guder, A., Cramer, C., and Bierbaum, G. (2000) Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Appl Environ Microbiol.*66: 2565-2571.

Argyry,A.A., G., Zoumpopoulou, K.A.,Karatzas, E. Tsakalidou, G. J.Nychas, E. Z. Panagou and C. C. Tassou, (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olive by in vitro tests. *Food.Microbiol.*33 (2):282-291.

Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., Coccagn-Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M., 2008. Métabolisme et ingénierie métabolique. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 271-447.

Atrih, A., and Foster, S. J. (2001a) Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *J Appl Microbiol.*91: 364-372.

Axelsson, L and Holck, A (1995).The Genes Involved in Production of and Immunity to Sakacin A, a Bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *Journal of Bacteriology*, (177), 8: 2125-2137 .

Axelsson, L :(1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Ed.S.Salminen and Avon Wright, Marcel Decer.p.1-72

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

Azar M, Ferguson T et Ghasseni H (1977) Microbiological aspect of shangak bread. *J Food Sci Technol*, 14: 251-253.

B

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D, KIHAL,M., Ouzrout, R (2005). Caracterisation phenotypique des bacteries lactiques isolées a partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabia et kabyle".Sciences &technologie n°23, pp. 30-37.

Bartali, E.H. (1987). Underground storage pits in morocco. Tunnelling and Underground Space Technology 2: 381–383.

Bartali,E.H.Safie, E.. and Persoons, E (1989). Stockage des céréales dans des entrepôts souterrains. Céréales en régions chaudes : conservation et transformation Aupelf J Libbey Eurotext,pp 27-38.

Bartali, H. et Debbarh, A. (1991) Evaluation et amélioration de la technique traditionnelle du stockage souterrain des céréales au Maroc, Terre et Eaux. Revue Marocaine des Sciences et Techniques du Développement Rural, n°82, pp 3-20

Barefoot,S,F et Klaenhammer, R. (1983): Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*, App, Env. Microbiol, 45: 1808-1815

Bauer , R. et Dicks, I.M.T.(2005). Mode of action of lipid H- targeting lantibiotics. Int.J.Food.Microbiol.101:201-206

Begley,M..Hill,C.,and Gaham,C.G.M.(2006).Bile salt hydrolase activity in probiotic. Appl.Environmental Microbiology. 72 (33): 1729-1738.

Bekhouche, F., Merabti, R., and Bailly J.D. (2013). Traditional couscous manufacture from fermented wheat (Algeria): investigation of the process and estimation of the technological and nutritional quality. Afr J Sci Technol: 167–175.

Belletti, N., Gatti, M., Bottari, B., Neviani, E., Tabanelli, G.et Gardini, F.(2009).Antibiotic resistance of lactobacilli isolated from two Italian Hard Cheeses. Journal of Food Protection, 72(10):2162-2169.

Belguesmia, Y., Naghmouchi, K., Chihib, N.-E., and Drider, D. (2011). Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Springer Verlag. Nantes, France. pp 1-41.

Beneche, R.O., Kheard, E.E, Laridi, R., Lacroix, C et Fliss, I((2002). Inhibition of *Listeria innocua* in Cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mited culture. Applied and Environmental Microbiology. 68:3683-3690

Benmechernene, Z., H.F. Chentouf, B. Yahia, F. Ghazi, M. Quintela-Baluja, J. Calo-Mata and Barros-Velázquez, J.(2013). Technological aptitude and applications of *Leuconostocmesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. Bio Med Research International. Volume 2013, Article ID 418132 P 14.

Ben Omar N and Ampe F (2000) Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. Appl Environ Microbiol 66, 3664-3673.

Berghofer, L.K., Hocking, A.D.; Miskelly, D and Jansson, E,(2003). Microbiology of wheat and flour milling in Australia .International Journal of Food Microbiology 85, pp 137-149.

Bervas,(1991). Mise au point des levains bactériens pour la panification. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal (Clermont II). 179 pages.

Björkroth, J., et Holzpaffel, W.(2003). Genera *Leuconostoc* , *Oenococcus* and *Weissella*. In Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource Edited by M. D. Workin. New York, Springer Verlag- Epub March 28.

Blondiaux, N., Gaillot O., Courcol, R. J. (2013). Identification bactérienne par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF : évaluation au CHU de Lille. Pathol. Biol. 58 : 55 – 57.

Boudreau A. et Ménard G. (1992). Le blé: éléments fondamentaux et transformation. Edition Presses Université Laval, Paris, pp 25 - 62.

Bourgeois, C. M et Larpent J, P. (1996) : Microbiologie alimentaire, Tome 2, Aliments fermentés et fermentation alimentaires, 2ème édition. Tech et doc. Lavoisier Paris, P523.

Bouzaine, T., ELMajdoub, T., Thort, PH.,et Damdi, M.(2004). Selection des bactéries lactiques probiotiques d'origine animale. *Microbio. Hyg.Alim.*16 :28.

Branlard.L .(2010) : identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyse protéomique de lignées waxy, thèse de doctorat en physiologie et génétique moléculaire, Unité mixte de recherche 1095 INRA, université Blaise Pascal, France, P 274

Bright J. J., Claydon M. A., Soufian M., Gordon D. B. (2002). Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *J. Microbiol. Methods* 48: 127–138.

Brooker Donald B., Bakker-Arkema Fred W., Hall Carl W. (1992). *Drying and storage of grains and oilseeds.* Springer; 468P. 32. Bushuk W., Rasper V.F. (1994).

Bron, P.A., Grangette,C.,Mercenier, A., De Vos, W.M.,and Kleerebezem, M. (2004). Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice.*J.Bacteriol.*186 : 5721-5729.

Bron, P.A., Molenaar, D., De vos, W.M., and Kleerebezem, M.(2006). DNA micro-arraybased identification of bile-responsive ggenes in *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.*100: 728-738.

Brown, J.H.(1919). *The use of blood agar for the study of streptococci*, Vol,9, New York: The Rockefeller Institute for Medical Research.

Bruno, F.A. and Shah, N.P. (2002).Inhibition of pathogenic and putrefactive microorganisms by acid lactic bacteria. *Milchwissenschaft.*57; 617-621.

Bullard, J.(2011). Interactions des bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides et effets sur les propriétés rhéologiques du yogourt. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval.

Butel, M .J.(2014). Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *Journal des Antiinfectieux* 16 (2) : 33-43.

Butt M. S., Nasir M., Akhtar S. and Sharif K. (2004). Effect of moisture and packaging on the Shelf life of wheat flour. *Internet Journal of Food Safety*, vol. 4, pp 1-6.

C

Cahagnier B. (1996).Céréales et produit dérivé In « microbiologie alimentaire » tome1 « aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments ». *Edition* Technique et Documentation Lavoisier, Paris, pp 392 – 414.

Cai, Yumin, Pang, H. (2011a). *Lactobacillus nasuensis* sp nov,a lactic acid bacterium isolated from silage and emended description of the genus *Lactobacillus* . *International Journal of Systematic andEvolutionaryMicrobiology*.

Cai, Yimin, Yang, Jinsong, Y.((2011b). *Lactococcus fujiensus* sp.nov, a lactic acid bacterium isolated from vegetable matter. *International Journal of Systematic andEvolutionary Microbiology*, 61(7);p.1590-1594

Calvel R., 1984. La boulangerie moderne. Edition EYROLLES, Paris, pp 19-20. 29.

Cardinal, M.J., Merghous, J, Lacroix, C., Simara, R.E.(1997). Isolation of *Lactococcus lactis* strains producing inhibitory activity against *Listeria*.*Food Biotechnol.*11:129-146.

Carr, F.J., Chill, D., et Maida, N.(2002). The Lactic Acid Bacteria. A literature Survey. *Critical Rev.Microbiol.*, 28:4, 281370.

Carriello, C.(2012). La spectrométrie de masse MALDI-TOF et le diagnostic microbiologique. Travail de diplôme ICHV, Laboratoire de microbiologie, Sion.

Claydon,M.A.,S.N. Davey,V. Edward and D.B.Gordon.(1996). The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat.Biotechnol.* 14 (11):1584-1586.

Caplice , E, Fitzgerald, G. (1999). Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Microbiol*, 50 (1-2): 131-149

Casado Muñoz, M., Benomar, N., Lavilla, L., Lerma, L., Gálvez, A., et Abriouel, H. (2014). Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. *International Journal of Food Microbiology*, 172: 110-118.

Chang, M.H., J.H. Chen, M.F. Lin, C.S Chen and S.C Wang, (2016). Antimicrobial activity *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented vegetables and investigation of the plantaricine genes. *African Journal of Microbiology Research*, 10: 796-803.

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins J.K. (1998b). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus species*. *J. Food Prot.* 61: 1636-1643

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli L., Collis, J.K. (2001). Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic *lactobacilli*. *Journal of Food Protection* 64, 2007-2014.

Chatterje, C., Paul, M., Xie, L. et Van Der Donk, W.A. (2005a). Biosynthesis and mode of actions of antibiotics, *Chems, Rev*, 105: 633-63

Chen, P., Lu, Y., Harrington, P.B. (2008). Biomarker profiling and reproducibility study of MALDI-TOF MS measurements of *Escherichia coli* by variance- principal component analysis. *Anal. Chem.* 80:1474-1481.

Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P. et al. (2010). Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J. Clin. Microbiol.* 48: 1169–1175

Cholet, O. (2006). Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire des procédés alimentaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole doctorale ABIES. UMR de génie et microbiologie des procédés alimentaires INRA.

- Chou, L.S et Weimer, B. (1999). Isolation and Characterization of Acid and Bile-Tolerant. Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sc.82: 23-31.
- Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Loubière P., Lindley N.D. (1996). Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*, *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 70, p. 253–26
- Cocconcelli, P.S.,et Fontana, C.(2008).In meat Biotechnollogy ; Characteristics and applications of microbial starters in meat fermentations. Eds f.Toldrà.Italie.129-148.
- Collins M.D et Aguirre, M. (1993): Lactic acid bacteria and human clinical infection. J. Appl. Bacterial, 75:95-107
- Colwell, R.R.(1970). Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio* numerical taxonomy of *Vibrio cholera parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. J. Bacteriol 104, 410-433.
- Corrieu, G. & Luquet, F. M.(2008) Bactéries lactiques : De la génétique au ferment. Paris: Édition Tec et Doc p. 849.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., and Damiani, P. (1998) Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. Appl .Microbiol Biotechnol.50: 253-256.
- Corsetti, A., P. Lavermicocca, M. Morea, F. Baruzzi, N. Tosti and M. Gobbetti, (2001). Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticumaestivum*) sourdoughs of Southern Italy International Journal of Food Microbiology 64:95-104
- Corsetti, A., L. Settani, C. Chavez Lopez,G.E. Felis, M.Mastrangelo and G.Suzzi. (2007). A taxonomy survey of lactic acid bacteria isolated from wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. Systematic and applied microbiology 30, 561-571.
- Corsetti A., Settanni L.(2007). Food Res. Int. 40, 539–558

Coppola, R., Succi, M., Tremonte, Reale,P.,Salzaano, G.et Sorrentino, E.(2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*: 85, 193-234.

Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2005a) Bacterial antibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Curr Protein Pept Sci*.6: 61-75.

Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, R. P. (2005b) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*.3: 777-788.

Cruz J.F., Dimanche, P., Ducamp-Collin M.N., Fliedel, G., Joas J., Marchand J.L., Mestres C. et Troude, F. (2002). La récolte, le stockage et la première transformation In « Mémento de l'agronome ». CIRAD-GRET. Editions Quae, Paris, pp 717-746.

D

Daeschel, M.A.; McKenney, M.C.; McDonald, L. (1989). Characterization of abacteriocin from *Lactobacillus plantarum*. Abstracts, 86th Ann. Meeting, Am. Soc.Microbiol.pp 277.

Dhar, N. et Mc Kinney, J.D.(2007). Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr.Op.Microbio*, 10:30-38.

Dalache, F. (2006). Effets inhibiteurs des bactéries lactiques. Bactériocines de *Lactococcus* et d'*Enterococcus* : mise en évidence d'un support plasmidique. Thèse de Doctorat en microbiologie moléculaire et génétique. Université d'Oran Es-Senia

Dalet, K., Briand, C., Cenatiempo, Y., and Héchar, Y. (2000) The *rpoN* gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr Microbiol*.41: 441-443

Darsanaki, R.K., Aliabadi, M.A., et Chakoosari, M.M.D.(2013). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria. *Scientific Journal of Microbiology*, 2(11): 201-206.

De Ambrosini, V.M., Gonzalez, S., Perdigon, G., DeRuiz Holgado A.P., Olivier, G.(1996). Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species, *Chem.Pharm Bull* 44(12), 2263-2267

Deegan, L. H., Cotter, P. D., and Hill, C. (2006) Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *Int Dairy J.*16: 1058-1071

Dellagio F., de Roissard H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D., (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). Loriga, Uriage. 1 : 25-116.

Delarras.C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle de produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques.Edi. Tec & Doc. Lavoisier (Paris)

Delgado,F., Flórez, A.B. et Mayo, B.(2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract.*Curr. Microbiol.*50:202-207.

Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44,100-117.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J.(1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69, 193–202

De Man, J.C., Rogosa, M; et Sharpe, M.E. (1960). A medium for cultivation of *Lactobacilli*. *J.Appl. Bacteriol.* 23:130-135

Denohue, D.C., (2004). Safety of novel probiotic bacteria In: Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects (SalminenS, Wrigh, A.V.et Ouwehand, A).3^eEd.Marcel Dekker NY 531-546

De Roissart, H.et Luquet, F.M. (1994). Bactéries lactiques II. Edition Loriga, Pp 39-45

Devirgillii, C., Caravelli, A., Coplla, D., Barile, S.et Perozzzi, G.(2008). Antibiotic resistance and microbial composition along the manufacturing process of Mozzarella di Bufala Campana. *Int.J.Food.Microbiol.* 128:378-384.

Devoyod, J.J. et Poullain.F, (1988). Les *Leuconostocs*. Propriétés : leur rôle en technologie laitière. Le lait, 68 (38) :249-280.

Diallo, A.A., Brugère, H., Kérourédan, M., Dupouy, V., Toutain , P.L., Bousquet-Mélou, Oswald, E., et Bibbal,D., (2013). Persistence and prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase –producing *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment receiving slaughterhouse wastewater. Water Res, 47:19-29.

Dicks, L. M. T., Heunis, D. A., van Staden, D. A., Brand, A., Sutyak Noll, K., and Chinkindas, M. L. (2011) Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In: Drider, D., and Rebuffat, S. (Eds). Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Springer Verlag. Stellenbosch, South Africa. pp 391-421

Diep, D.B., Havarstein, L.S and Nes,I.F.(1996). Characterization of the locus Responsible for the Bacteriocin Production in *Lactobacillus plantarum* C11. Journal of Bacteriology, 178, 15:4472-4483.

Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., and Nes, I. F. (2007) Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. Proc Natl Acad Sci U S A.104: 2384-2389.

Devriese, L.A., Pot, B et Collins, M.D(1993). Phénotipic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation phylogenically distinct enterococcal species and species groups: *J.Appl.*75:399-408

Devriese , L.A., et Pot, B.(1995).The genus *Enterococcus*. In the Genera of Lactic Acid Bacteria A.B, pp.327-367. Etuted by B.J.B.Wood et W.H. Holzapfel. London; Blackie Academic et Profesioonal.

De Vuyst, L. and E.J, Vandamme, (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In; De Vuyst, L. and E.J.Vandamme, eds. Bacteriocins of lactic acid bacteria microbiology, genetics and applications. London: Blackie Academic and Professional, 91- 142

De Vuyst, L. and P. Neysens. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci Techn* 16, 43-56.

De Vuyst, L. and M. Vancanneyt, (2007). Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiol* 24: 120-127.

Doleyres, y. (2003). Production en continu de ferments probiotiques par la technique des cellules immobilisées. Faculté des études supérieures de l'université de Laval Quebec Pp :5-8

Dortu, C. (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse de doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique Faculté des sciences universitaire agronomiques de Gembloux.

Dortu, C. and P. Thonart, (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13 (1), pp 143-154.

Doumandji, A, Doumandi-Mitiche, B, Salaeddine, D (2003) Cours de technologie des céréales technologiques de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage Office des Publications Universitaires, pp :1-22

Doyle, M.P. and Buchanan, R.L. (2012). *Food Microbiology: fundamentals and frontiers* (American Society for Microbiology Press).

Drider D, Fimland, F Héchar, McMullen, Y.M. Prévost, H (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins *Microbiology and molecular biology reviews* 70 (2), 564-582

Drouault, S. et Corthier, G. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet. Res.*, 32 :101-117.

D'aimmo, M.R., Modesto, M. et Biavati, B. (2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* isolated from dairy and Pharmaceutical products. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 35-42.

Dunford Nurhan Turgut. (2012). Food and industrial bioproducts and bioprocessing. Wiley-Blackwell; 392 P

E

El-Ziney, M.G., Uyttendaele, M., Debevere, J., Jakobsen, M. (1998). Characterization of growth and metabolite production of *Lb. reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Lett.* 20(10), 913-916.

Ennadir, J., Hassikou, R., Al Askari, G., Arahou M., Bouazza, F., Amallah, S.A., Amine, K., Khedid, (2014). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat flour from Morocco. *Mater. Environ. Sci.* 5 (4) 1125-1132.

Ennahar, S., Assobhel, O. and Hasselmann, C. (1998). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH Producer. *J. Food. Prot.* 61(2) :186-91.

Ennahar, S., Cai, Y. & Fujita, Y. (2003). Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Appl Environ Microbiol* 69, 444-451.

Euzeby, J.P. (1997). List of Bacteriological Names with standing Nomenclature folder available on the internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 590-592.

F

FAO. (1994). Syntheses de l'expérience africaine en amélioration des techniques après récolte. Journées Techniques accra, Ghana, 4-8 juillet, 41 Pp.

FAO/WHO, experts, (2001). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Cordoba, Argentina, Pp34.

FAO/OMS, (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in foods: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002

- Faid M, Boraam F, Zyani I et Larpent JP (1994) Characterization of sourdough bread ferments made in the laboratory by traditional methods. *Z Lebensm Unters Forsch.* 198: 287-291
- Fang., F., Li, Y., Bumann, M., Raftis, E.J., Casy, P.G., Cooney, J.C., Walsh, M.A., and O'Toole, P.W. (2009). Allelic variation of bile salt hydrolase genes in *Lactobacillus salivarius* does not determine bile resistance levels. *J Bacteriol* 191:5743-5757
- Feillet.P.(2000). Le grain de blé, composition et utilisation. Edition INRA, Paris, 308 p.
- Fguiiri, I., Ziadi, M., Abassi, M., Arroum,S,et Khorchi, T.(2012). Suitability of camel milk to transformation in leben by lactic starter. *African journal Microbiology Research*, 6(44):7185-7192.
- Fimland, G., Johnsen, L., Axelsson, L., Brurberg, M. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G., and Nissen-Meyer, J. (2000) A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J Bacteriol.* 182 : 2643-2648.
- Fitzpatrick K .C.(2005). Probiotiques : document de travail rapport présenté à la direction des produits de santé naturels, santé Canada. 32p
- Fleming, H.P., J.L. Etchells and R.N. Coslilow, (1975). Microbiological inhibition of isolate of *Pediococcus* from cucumber brine. *Appl. Environ. Microbiol.* 30: 1040-1042.
- Flórez, A.B., Delgados,S. et Mayo (2005). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from cheese environment. *Can. J. Microbiol.* 51:51-58.
- Florou- Paneri, P., E.Christaki, E and Bonos, E. (2013). Lactic acid bacteria as source of functional ingredients (INTECH Open Access Publisher).
- Freiwald, A. et Sauer, S. (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols* , 4, 732–742.

- Fukao, M., Yajima, N. (2012). Assessment of Antibiotic Resistance in Probiotic Lactobacilli, Antibiotic Resistant Bacteria- A Continuous Challenge in New York. Pana(Ed). 503-512.
- Fuller, R., (1989). A review: Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol., 66, 365-378.

G

- Garvie, E.I. (1984). Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostocs* from other lactic acid bacteria. Dans *Methods in Microbiology* NY, USA: T. Bergan, p.149-178.
- Gálvez A., Lopez R.L., Abriouel H., Valdivia E. & Omar N.B. (2008) Application of bacteriocins in the control of food borne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28: 125-135
- Gálvez, A., H. Abriouel, N. Ben Omar and R. Lucas, (2011). Food Applications and Regulation. In: D. Drider and S. Rebuffat, *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Eds: Springer Verlag, Spain. pp253-390.
- Gbassi K.G., Vandamme T., Yolou S.F. et Marchioni E., (2011). In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. *Int. Dairy J.* 21 : 97-102.
- Geis, A. (1989). Antagonistic compounds produced by lactic acid bacteria. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*. 41, 97-104.
- Gerrit, S., A.S. Bart and J.M.E. Win, (2005). Flavour formation by acid lactic bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products. *FEMS. Microbiol. Rev.* 29:591-610.
- Gidde, S. (2001). Identification bactérienne par la technologie MALDI-TOF. *Rev. Tech. Luxembourg*. 1 : 38-43.
- Gilarova, R., Voldrich, M., Demnerova, K., Cerovsky, M. & Dobias, J. (1994). Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *Int. J. Microbiol* 24:315-319

- Gilliland, S.E.(1985).Concentrated starter culture . In Bacterial starter cultures for food. Gilliland SE(ed) CRC Press Inc. Boca Raton , USA, 145-157.
- Givry, S. et Duchiron, F. (2008). Optimization of Culture Medium and Growth Conditions for Production of L-Arabinose Isomerase and D-Xylose Isomerase by *Lactobacillus bifementans*. *Microbiology* 77 (3): 281–287.
- Gobetti M, Simonetti MS, Corsetti A, Santinelli F, Rossi J et Damiani P (1995) Volatile compound and organic acid production by mixed wheat sour dough starters: influence of fermentation parameters and dynamics during baking. *Food Microbiology*, 12: 497-507.
- Gomez, A.M.P.and Malcata, F.X.((1999). “*Bifidobacterium* sp and *Lactobacillus acidophilus*: biological, technological, biochemical and therapeutical properties relevant for use as probiotics” *Trends in Food Science&Technology* 10: 139-157
- Golshan Tafti, A., S.H. Peighambaroust, M.A. Hejazi and M.H. Moosavy, (2014). Diversity of *Lactobacillus* strains in Iranian Traditional Wheat Sourdough. *Journal of Food Quality & Hazards Control* 1:41-45.
- Gourchala,F.,A.F. Hobamahoro,F.Mihoub and C. Henchiri, (2014). Effect of natural fermentation on the nutritional quality of “El hamoum” *durum* wheat (*Triticum durum*) fermented product of the Algerian country. *International journal of biotechnology and research (IJBTR)*, vol 4, 4, 9-18.
- Gowri, S., Ghost, A.R.(2010). *Pediococcus ssp.* - a potential probiotic isolated from Khadi (an Indian fermented food) and identified by 16 S rDNA sequences analysis. *Afr J Food Sci.*4:597-602.
- Gracia-Fontain, M.N.,Lorenzo, J.M., Martinez, S., Franco, I ., Carbello, J. (2007). *LWT- Food. Sci.Tech* (40), 1610.
- Guarner F., Malagelada ,J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 2003, 361 : 512- 519.
- Guder, A., Schmitter, T., Wiedemann, I., Sahl, H. G., and Bierbaum, G. (2002) Role of the single regulator MrsR1 and the two-component system MrsR2/K2 in the regulation of mersacidin production and immunity. *Appl Environ Microbiol.*68: 106-113.

Guiraud J.P., (1998). Microbiologie alimentaire. 1e Ed., Dunod. Paris. 136-144.

Guiraud, J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris

Gu, X. , Yang ,Z.Q., Li, Z.H., Chen,S.L. et Luo, Z.I.(2008).Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, Chine. Anaerobie. 14: 313-317

Guyot J-P (2010) Fermented Cereal Products. In Fermented Foods and Beverages of the World, pp. 247-261: CRC Press.

H

Haard Norman., Odunfa S.A., Lee Cherl-Ho. (1999). Fermented cereals: A global perspective. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 114P.

Hammes, W.P., et Vogel, R.F.(1995). The genus *Lactobacillus*. The genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic and professional.London

Hammes, W.P. and C. Hertel,(2003). The genera *Lactobacllus* and *Carnobacterium*. Prokaryotes. 4: 320-403.

Hammes, W.P.,Brandt ,M.J., FrancisK.L.,. Rosenheim,J.,. Seitter, M.F.H.and Vogelmann, M.,(2005). Microbial ecology of cereal fermentations. Trends in Food Science & Technology 16: 4–11.

Hammes, W.P. and C. Hertel,(2006). The genera *Lactobacllus* and *Carnobacterium*. Prokaryotes. Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource Edited by M. D.workin.New York, Springer Verlag-Epub December.

Hamon, E., P. Horvatovich, E.Izquierdo, F. Bringel, E. Marchiono, D.Aoudé-Werner and S. Ennahar, (2011). Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. BMC Microbiol 11, 63.

- Hancock, R. E. (2000) Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*.9: 1723-1729.
- Hanson E.W. et Christensen J.J. (1953). The black point disease of wheat in the United States. *Tech. Bull. 206. MINN. AGRI*: 30.
- Hardy JL (1982). In *Mise au point d'une technique de panification sur levain à partir de ferments céréaliers associés*. Thèse UTC, Compiègne, France.
- Harrigan, W.F. et Mc Cance, M.E. (1976). *Methods in Food and Dairy Microbiology*, Academic Press, Orlando. Eds. Laboratory.
- Hartke, A., B. Bouche, J.C. Giard, A. Benachour, P. Boutibonnes and Y. Auffray.(1996).The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *Curr.Microbiol.*, 33: 194-199.
- Helander, I.M., Von Wright., et Mattila- Sandholm, TM. (1997). Potentiel of lactic acid bacteria novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 8:146-150
- Hemmersbach P. (2008). Special geature: Historical - History of mass spectrometry at the Olympic Gales. *J. Mass Spectrom.* 43(7):839-53.
- Heng, N. C. K., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., and Tagg, J. R. (2007a) The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley, M. A., and Chavan, M. A. (Eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer Verlag. Berlin Germany. pp 45-92.
- Heredia, N., Wesley, I., Santos, G.(2009). *Microbiologically safe foods*, John Wiley, Pp 596.
- Herrerros,M.A., Sandoval, H., Gonzalez,I,CastroJ.M., Fresno, M.E.. et Tornadijo, M.(2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (aSpanish goat's milk cheese). *Food Microbiol.*22: 455-459.
- Ho T.N.T., Taun N., Deschamps A., Cauber, T. (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam: Workshop on Food Safety and Processing Technology, p. 134-142.

Hollande, R.D., Wilkes, J.G., Rafii, F., Sutherland, J.B., Persons, C.C., Voorhees, K.J., Lay Jr., J.O., 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 1227–1232

Höltzel, A., Gänzle, M. G., Nicholson, G. J., Hammes, W. P., and Jung, G. (2000) The First Low Molecular Weight Antibiotic from Lactic Acid Bacteria: Reutericyclin, a New Tetramic Acid. *Angew Chem Int Ed Engl.*39: 2766-2768.

Holzappel, W.H, Geisen, R.et Schillinger, U. (1996). Biological preservation of foods with reference to protective cultures,bactériocines and food-grade enzymes.*Int. J.Food.Microbiol* :343-362

Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. et Schillinger U.(2001).Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*73 (Suppl): 365-373.

Hoseney, R. C. (1994). Principles of cereal science and technology. 2 nd Edition, American Association of Cereal Chemists, 378 p.

Houlihan A. J. and Russell, J.B. (2006). The effect of calcium and magnesium on the activity of bovicin HC5 and nisin. *Current Microbiology.* 53, 5, 365-369.

Hsia, C., Siebert, K (1999).Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *Int. J.Microbiol.*Pp: 189-201.

Hughenoltz J. & Kleerebezem M. (1999). Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10(5), 492-497.

Humbolt, C. and J.P. Guyot. 2009. Pyrosequencing of Tagged 16S rRNA Gene Amplicons for Rapid Deciphering of the Microbiomes of Fermented Foods Such as Pearl Millet Slurries. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 4354–4361.

Hydrominus, B., P. Le Marres, A. Hadj Sassi and A. Deschamps. (2000). Acid and bile tolerance of spore forming lactic acid bacteria. *Int.J. Food.Microbiol.* 61: 193-197

I

Infantes, M., Tourneur, C. (1991). *Sciences alimentaires.* 527-545.

J

Jeantet, R. (2007). *Sciences des aliments : biochimie, microbiologie, procédés, produits (Tec & Doc).*

Jimenez-Diaz, R., Rios, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.J. et Piard, J.C. (1993). Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1416-1424

Juillard V., Spinnler H.E., Desmazeaud M.J. et Boquien C.Y., (1987). Phénomène de coopération et inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. *Le lait.* 67 : 149-172. Kacem M. et Karam N.E., (2006). Physicochemical and microbiological study

K

Kailasapathy K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria : technology and potential applications. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.* 3 : 39-48.

Kanafani-Z. A. (1994). *Mūne : La conservation alimentaire traditionnelle au Liban.* Editions de la Maison des sciences de l'homme. Paris ; 266 P.

Karam, N.E., et Karam, H. (1994). Isolement et caractérisation des bactéries lactiques de laits crus d'Algérie. In *Alimentation, Génétique et Santé de l'enfant* PP257-264. Ed. Desjeux, J.F. et Touhami, L'harmattan.

Kandler, O. (1983). Carbohydrates metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:209-224.

Kandler, O., et Weiss, N.(1986).Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901. In Bergey's manual of systematic bacteriology..1209-1234. Edited by P.H.A.Sneath, N.S. Mair, M.E.Sharpe et J.G.Holt.Baltimore: William et Wilkin.

Karovicova, J. et Kohajdova, Z. (2003). Lactic acid fermented vegetable juices. Hort.Sci.(Prague), 30, (4):152-158.

Kashet, E.R.(1987). Bioenergies of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH osmotolerance. *FEMS Microbiol.Rev.*46: 233-244

Katina, K., Sauri, M., Alakomi, H.L., Matilla-Sandholm, T.(2002). L.W.T.Food Sci.Tech. 35, 38-45

Katla, A., Kruse, H., Johsen,GG.et Herikstad, H.(2001). Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int.J.Food.Microbiol.*, 67:147-152.

Khalid, N.M., et Marth, E.H. (1990). *Lactobacilli*, their enzymes and role. In: Ripening spoilage of cheese. *Rev.DairySc*, 73:158-167

Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C. et Meile, L.(2006). Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used food. *Syst. Appl. Microbiol*, 29: 145-155.

Kermanshahi, R.K., L. Goudarzi and Z. Savinezhad, 2014. Antimicrobial activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus* bacteria against *Proteus* species. *Advances in Environmental Biology*, 8: 1567-1572.

Kheddid, K., M. Faid, A. Soulaymani, A.Zineddine, 2006. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological Research*

Klaenhammer, T.R. (1988): Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70 (3), 337-349

Klaenhammer, T.R. (1993).Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria *FEMS Microbiology*, 12:39-89

Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Muller-Bertling, S., White, W et Gossens, H. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolated and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59: 900-912.

Klein, G., Pack, A., et Bonaparte, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 103-125

Kodio O. (1989). Structures paysannes de stockage. Céréales en régions chaudes. AUPELF-UREF, Edition John Libbey Eurotext, Paris, pp 19-25.

Khöll, P.R., Mandar, R.H., Marcotte, H., Leibur, E., Mikelsaar, M.H., Ammarstrom, L. (2008). Characterization of oral *Lactobacilli* as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol. Immunol.* 23: 139-147.

Koo, O.K., S.M. Kim and S.H. Kang, (2015). Antimicrobial potential of *Leuconostoc* species against *E. coli* O157: H7 in ground meat. *Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 58: 831-838.

Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Pinto, C., Egountely .H. , M., Sossa, C., Mbugua, S., Dortu, C., Thonart, P., Taljaard, L., Mengu, M., Franz, C.M.A.P. and Holzappel, W.H. (2007). Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 342-351

Kröckel, L. (2013). The role of Lactic Acid Bacteria in safety and flavor development meat and meat products. *R&D for Food, Health and Livestock purposes*. In tech, 2: 129-152.

Kusińska E. (2001). Effet de la teneur en humidité des grains de triticale sur l'échauffement spontané des grains et sur la pression contre la paroi du silo. *Int. Agrophysic*, vol. 15, pp 247-254.

L

Labioui, H., El Moualdi, L., El Yachioui, M., Ouhssine, M. (2005). Selections de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bulletin de la société de pharmacie de Bordeaux. 144 : 237-250.

Lahtinen S., Salminen S., Ouwehand A., Wright A.V. (2011). Lactic acid bacteria, Microbiological and functional aspects. 4^{ème} édition. Boca Raton : CRC Press.

Lambert, J.M., Bongers, R.S. De Vos W. M., and Kleerebezem, M. (2008). Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFSL. Appl. Environ Microbiol 74:4719-4726

Lamoureux L. (2000). Exploitation de l'activité β -galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. National Library of Canada. 23-47.

Larpent, J.P. (1997). Mémento technique de microbiologie. 3^{ème} Ed. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. Pp 910.

Larpent-Gourgaud, M., Michaux, O., Larpent, J.P., Desmasures, N., Mangin, I., Masson, F., Montel, M.C., et Talliez, P. (1997). Les ferments lactiques et bactéries apparentés. In microbiologie alimentaire : Technique de laboratoire. Larpent J P Tec et Doc, Lavoisier, pp : 199-255.

Lartigue M.F., Héry-Arnaud G., Haguenoer E., Domelier A.S., Schmit P.O., vander Mee Marquet N. (2009). Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 47: 2284–2287

Lash B.W., T.H. Mysliwiec and H. Gourama, (2005). Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). Food Microbiol. 22:199-204.

- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., and Gobbetti, M. (2000) Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol.*66: 4084- 4090.
- Leahy S. C., Higgins D. G., Fitzgerald G. F. and Van Sinderen D.(2005). Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98 pp: 1303-1315. Leatherhead Food Research, 2009.
- Leclerc, H., Gaillard, F.L. et Simonet, M. (1994). Les grands groupes de bacteries. In : *Microbiologie générale : La bactérie et le monde microbien*. DOIN. Paris.445p
- Lei, V. and M. Jakobsen, M.(2004). Microbiological characterization and probiotic potential of koko and koko sour water, African spontaneously fermented millet porridge and drink. *Journal of Applied Microbiology* 96: 384–397.
- Leisner, J.J., Vancanneyt, M., Goris, G., Christensen, Het Rusul, G. (2000). Discription of *Paralactobacilluselangorensis* gen .nov., sp.nov., a new lactic acid bacterium isolated from chilli bo. a Malisian food ingredient. *Int. J. Sys Evol. Microbiol.* 50: 19-24
- Leveau J.Y., Boiux M. et De Roissart H.B. (1991). *La flore lactique : technique d’analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires*. 2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3: 240P.
- Lonner C et Preve-Akesson K (1988) Effects of lactic acid bacteria on the properties of sour dough of wheat flour bread. *Food Microbiology*, 6 :19 -35.
- Loubière, P & Coccain-Bousquet,M(2009).Métabolisme des bactéries lactiques : devenir du carbone. Dans *bactéries lactiques physiologie, métabolisme génomique et applications industrielles*, Paris, France :Drider, D and Prévost, H. , p.29-50.
- Louembé, D., S. Léléké, S.C. Kabawila and J.P.Nzouzi,(2003). Bactéries lactiques de la pâte fermentée de maïs au Congo. Article original, *Tropicultura*, 21, 1,3-9
- Lin, W.H., Shen, H.J., et Hang,T., (2007). Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe.*13-107-113.

Luquet, F.M. et Corrieu, G. ((2005). Bactéries lactiques et probiotiques. Tech& Doc, Lavoisier. Paris, 3-37.

M

Mahdhi, A., Harbi,B., Angeles Esteban, M., Chaieb, K., Kamoun, F.,et Bakhrouf, A. (2010b).Using mixture design construct consortia of potential probiotic Bacillus strains to protect gnotobiotic *Artemia* against pathogenic *Vibrio*.Biocontrol Sci Techn 20: 983996.

Mc Auliffe, O, Ross, R.P.et Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS. Microbiol. Rev.25:285-308

Makarova, K.S. & Koonin, E.V.(2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. J. Bacteriol 189, 1199-1208.

Makhloufi, K.M. (2012). Caractérisation d'une bactériocineproduite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza.

Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E.(2006). Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated fromdairy products. Int. Dairy. J. 16: 189-199.

Mataragas M., Drosinos E.H., Tsakalidou E. & Metaxopoulos J. (2004). Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *L. curvatus* L442. Antonie van Leeuwenhoek, 85, 191-198.

Mathew S. (2010). A review on the wheat grain quality under post harvest storage. International Journal of Pharmaceutical and Applied sciences/1 (2). ISSN : 0976-693

Mayeux, J.V., Sandine, W.W.E. et Elliker , P.R. (1962). A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed isolate starter cultures. J. Dairy, Sci, 45:655-656.

- Meghrous, J., Lacroix, C. and Simard, R.E.(1999). The effect of vegetative cells spores of three bacteriocines from lactic acid bacteria. *Food Microbiology*;16: 105-114
- Mercenier, A., Pavan, M. and Pot, B.(2003). Probiotic as biotheurapeutic agents: Present knowledge and future prospect. *Current pharmaceutical design*, 8:99-110.
- Messi, P., M. Bondi, C.Sabia, R. Battini and G. Manicardi, (2001). Detection and preliminary characterization of bacteriocin (plantaricin 35d) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Int.J.Food. Microbiol.*64: 193-198.
- Metschnikoff E.(1908). Prolongation of life. New York. Putnam.
- Moëller V. (1955): Simplified tests of some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 36: 158-172.
- Mohankumar, A. and N. Murugalatha,(2011). Characterization and antibacterial activity of bacteriocin producing *Lactobacillus* isolated from raw cattle milk sample. *International Journal of Biology*, 3: 128-143
- Morency, H., Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C., and Lavoie, M. C. (2001).Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Can J Microbiol.*47: 322-331.
- Moreno,M.R.F,SarantinopoulosP.,Tsakalidou,E.,DeVuyst,L.(2006).*Int.J.Food.Microbiol*(106), 1-24.
- Millette, M., C. Dupont, F. Shareck, M.T. Ruiz, D. Archambault and M. Lacroix. (2007). Purification and identification of the Pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain. *Journal of Applied Microbiology*
- .
- Millette, M. (2008). Étude de bactéries lactiques à potentiel probiotique et de leurs métabolites Thèse. Québec, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique, Doctorat en biologie, 258 p

Monnet V., Latrille E., Béal C. et Corrieu G.(2008). Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 512-592.

Multon J.L. (1982). Conservation et stockage des grains et graines et produit dérivé. Volume 01, Edition Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 576 p

Mundt, J.O., Hammer, J.L.(1968). *Appl. Microbiol* (16), 1326-1330.

Muyanja C.M.B.K., Narvhus, J.A J. Treimo,J and T. Langsrud ,T (2003). Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International journal of food microbiology* 80: 201–210.

N

Nacef, M., M. Chevalier, S. Chollet, D. Drider and Ch. Flahaut,(2016). MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a french cheese: The Maroilles, *Int:J.Food Microbiol*

Nehem Nancy. (2008). Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni* impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes. . Thèse pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse.

Ness, T.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijjinsk, V.G.H. et Holo, H. (1996). Biosynthesis of bactériocines in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 70, 113-128.

Nguyen, C.and F. Carlin. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Crit.Rev. Food Sci. Nutr.*, 34:371.

Nigutova K. (2007). Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram+ cocci. *J. Appl. Microbiol.*, 102(2), 563-569.

Nionelli, L., N. Curries, J.A.Curiel, R. Di Cagno, E.Pontonio,I. Cavoski, M. Gobbetti and C.G.Rizello.(2014). Exploitation of Albanian wheat cultivars: Characterization of the flours and

lactic acid bacteria microbiota and selection of starters for sourdough fermentation. In Food Microbiology 44, 96-107

Nielsen D.S., Jacobsen T., Jespersen L., Koch A.G., Arneborg N. (2008). Occurrence and growth of yeasts in processed meat products -Implications for potential spoilage. Meat Science, vol. 80, p. 919-926.

Nilsen, T.I. Nes, F and Holo, H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Applied and Environmental Microbiology 69:2975-2984.

Nissen-Meyer, J., Holo, H., Håvarstein, L. S., Sletten, K., and Nes, I. F. (1992) A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. J Bacteriol. 174: 5686-5692.

Niquet, G. (2006). Stockage à la ferme des grains Issus de l'agriculture biologique. Office national interprofessionnel des céréales. Institut du Végétal ARVALIS, pp 1-4.

Nousiainen J., Javanainen P., Setälä J. et Wright A.V., (2004). Lactic acid bacteria as animal probiotics. In : Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 547-560.

O

O'Connor, E.B., O'Sullivan, O., Stanton, C., Danielsen, M., Simpson, P.J., Callanan, M.J., Ross, P., et Hill, C. (2007). Peco1: a plasmid from *Pediococcus acidilactici* which encodes an identical streptomycin resistance (aadE) gene to that found in *Campylobacter jejuni*. Plasmid 58: 115-126.

Ogier, J. C., Casalta, E., Farrokh, C., and Saihi, A. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. Int J Food Microbiol. 126: 286-290.

Orla-Jensen. (1919): The lactic acid bacteria, Rey, Sci, Lett, Copenhagen seet. Sci 5: 81-196

Oppegård, C., Fimland, G., Thorbaek, L., and Nissen-Meyer, J. (2007a) Analysis of the two peptide bacteriocins lactococcin G and enterocin 1071 by site-directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol.*73: 2931-2938

O'Sullivan, O., O'Callaghan, J., Sangrador-Vegas, A., McAuliffe, O., Slattery, I., Kaletta, P., Callanan, P., Fitzgerald, G.P., Ross, R.P., and Beresford, T. (2009). Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiol.*9:50

Ouaba, L.I.I., Lei, V., Jensen, L.B. (2008). Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials. Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *Int. Food. Microbiol.* 121: 217-224.

Ouwehand, A., S. Salminen and E. Isolauri, (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82: 279-289.

P

Palomares, I.C, Perez-Morales, R., et Acedo-Felix, E. (2007). Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev. Latinoam. Microbiol.*49(3-4): 46-54.

Papagiani, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol. Adv.*21:465-499

Papagianni, M., and Anastasiadou, S. (2009) Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microb Cell Fact.*8: 3.

Paramithiotis, S., Chouliaras, Y., Tsakalidou, E., Kalantzopoulos, G. (2005). *Process. Biochemistry.* 40 (8) 2813-2819

Parente, E. et Riccardi, A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*52. 628-638

Patterson, C.A. (2008). Probiotiques : bienfaits au-delà des fonctions nutritionnelles de base. *AAFC.* 1-4.

Patton, G.C.&Van Der Donk, W.W.A.(2005). New developments in antibiotic biosynthesis and mode of action. *Curr.Opin.Microbiol*, 8,543-551.

Piard, J.C.; Desmazeaud, M.J.(1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. I. Oxygen metabolites and catabolism end products. *Le Lait*, 71, 525.

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

Piquepaille. C.(2013). Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales [Thèse].Pharmacie .Limoge . 183p

Podolack, P.K., Zayas, J.F.,Kastner, C.L., et Fung, D.Y.C., (1996).Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7on beef by applicationof organic acids.*J.Food Prot.*59:370-373.

Pot B. (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. *In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris.1-106.*

Prasad, J., H. Gill, J. Smart and P.K.Gopal, (1998). Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics, *International Dairy Journal* 18: 993-1002.

Prioult G., (2003). Effet des probiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la β lactoglobuline chez la souris et étude de leurs mécanismes d'action. Thèse présentée à l'Université.

Pfeiler, E.A. and T.R. Klaenhammer, (2009). Role of transporter proteins in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol.* 75:6013-6016

Q

Quere, F., Deschamps, A., et Urdaci, M.C.(1997). DNA probe and PCR—specific reaction for *Lactobacillus plantarum*.*J.Appl. Microbiol.* (82), 783-790.

R

Rauch, P.J.G. et De Vos, W.M. (1992a). Characterisation of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn 5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. J.Bacteriol. 174: 1280-1287.

Reimbert MA. (1982): Silos, théorie et pratique. Calcul fonctionnement et réalisation. Eyrolles Paris.

Reale, A., T., Di Renzo, M. Succi, P. Tremonte, R. Coppola and E. Sorrentino, (2011). Identification of *Lactobacilli* isolated in traditional ripe wheat sourdoughs by using molecular methods. In World Journal of Microbiology and Biotechnology

Rhee, S.J., Lee, L.E. et Lee, C.H.(2011). Importance of lactic acid bacteria an Asian fermented food. Microbio.Cell.Factories, 10, 1-13.

Reyes-Gavillan, C.G., Suarez, A., Fernandez-Garcia, M., Margolles, A., Gueimonde, M.,et Ruas-Madiedo, P.(2011). Adhesion of bile –adapted Bifidobacterium strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. Res.Microbiol.162:514519

Riccardi, A., Parente, E., Piraino, P.Paraggio, M Romano, P.(2005). Phenotypic characterization of lactic acid bacteria from sourdough for Altamura bread produced on Apulia (Southern Italy). Int. J. Food. Microbiol, 98:63-72.

Richard, C.,Caffon, R., Naghmouchi, K., Bertran, D., Prévost, H.and Drider, D.(2006).Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bactériocines.Foods Microbiology, 23:175-183

Richard-Molard M., (1998). Microbiologique des céréales et des farines In « Les industries de première transformation des céréales. *Edition Techniques et Documentation Lavoisier*. Paris, pp 159 – 173

- Robert,H.,V. Gabriel, D. Lefebvre, P. Rabier, Y. Vayssier and C. Fontagné-Faucher, (2006).Study of the behaviour of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. *LWT Food Sci. Technol*, 39,256-265.
- Robert,H.,V. Gabriel, C. Fontagné-Faucher, (2009). Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *Int.J. Food Microbiol.* 135,53-59
- Robertson, A., Tirado, C., Lobstein, T., Jermini, M., Knai, C., Jensen, J. H., Ferro-Luzzi, A., and James, W. P. (2004) Food and health in Europe: a new basis for action. WHO Reg Publ Eur Ser: i-xvi, 1-385, back cover
- Robin, J.M. et Rouchy., (2001). Les probiotiques . CEDN.Nutrithérapie.Info 1-4
- Rodríguez, J. M., Martínez, M., and IKok, J. (2002) Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr.*42: 91-121.
- Rokka S. et Rantamaki P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur. Food Res. Technol.* 213 : 1-12.
- Rosslund E, Langsrud T, Granum PE, Sorhaug T (2005). Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *Int. J. Food. Microbiol.* 98(2): 193-200.
- Rosenquist, H.and A. Hansen, (2000). The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. *Food Microbiology.* 17:241-250.
- Ross, R. P., Morgan, S., and Hill, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *Int J Food Microbiol.*79: 3-16.
- Rothe M et Blaut M.(2013). Evolution of the gut microbiota and theinfluence of diet. *Benef Microbes* 4(1):31-7

Ruiz- Moyano, S., Martin, A., Benita, M.J., Nevado, F.P., Cordoba, M.G.(2008). Meat Sciences, (80), 715-721.

.Russo, P., R. Bellegia,S. Ferrer, I.Pardo,I and G.Spano,(2010). A polyphasic approach in order to identify dominant lactic acid bacteria during pasta manufacturing. LWT-Food Science and Technology 43,982-986

S

Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Matto J., et Mattila-Sandholm T.(2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84 : 197-215.

Saito, T. (2004). Selection of the useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their application to functional foods.Anim.Sci.J.75: 1-13.

Samelis, j., Maurogenakis, F. et Metaxopoulos, J. (1994). Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry Salami. Int.J.Food.Microbiol. 23:179-196.

Sarika, A.B., Lipton, A.P., Aishwarya, M.S. (2010). Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus fhamonus* GPI under different culture conditions. Ad.J.Food.Sci.Technol, 2: 291-297.

Šramková Z., Gregová E. and Šturdíka E. (2009). Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. Acta Chimica Slovaca, vol. 2, pp 115 – 138.

Savijoki K., Ingmer H. et Varmanen P.(2006.) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71 : 394-406.

Schleifer K.H. (1987). Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.Letters*. 46 : 201-203.

Schottmüller, H. (1903). Die artnunter scheidung der für den Menschen pathogenen Streptokokken durch Blutagar .Munchen Medical Wochenschr, vol.50p 908

Senock, A.C., A.Y. Ismaeel and G.A.Botta (.2005.) Probiotics: facts and myths.Clin Microbiol Inf11:958-966.

Servin, A.L. (2004). Antagonistic activities of *Lactobacilli* and *bifidobacteria* against microbial pathogens.FEMS Microbiol Rev. 28: 405-440.

Sherman, J.M.(1937).The streptococci . Bacteriol. Rev. 1, 3-97

Sieuwert, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J. et van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008). Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches. Applied and environmental microbiology 74, 4997-5007.

Simpson , W.J et Taguchi, H.(1995). The genus *Pediococcus* withnotes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerrococcus*. In the Genera of lactic acid bacteria, Wood BJB., Holzapfel WH, Eds; Chapman & Hall, London, 125-172.

Singh, S.,Ahmed,S.,et Pandey,A.(2006). Metabolic engeneering approaches for lactic acid bacteria.Prod.Process.Biochem 41, 199-1000.

Singhal, K., H. Joshi and B.L. Chaudhary, (2010). Bile and acid tolerance ability of probiotic *Lactobacillus* strains. J Pharma Techn 2:17-25.

Song, H.J. and J.Richard,(1997). Anti-*Listeria* activity of three bacteriocins used sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. Int.J.Food. Microbiol, 36 (2), 155-161.

Sperber. H. and Swan J. (1976). Hot-loop test for the determination of carbon dioxid production from glucose by lactic acid bacteria. Environ Microbiol, vol.31, p. 990-991.

Spicher, G. (1983). Bakeed goods. In Biotechnology. Vol 5 Food and feed production with microorganisms. Ed. Rehm H.G., Reed.G. Verlag chemie. Weinheim.

Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie Van Leuuenhoek, 70, 235-249.

Stiles, M.E. and W.H. (Holzapfel, 1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food. Microbiol* 36, 1-29.

Swain, M.R., Anandharaj, M., Ray, R.C., et Rani, R.P.(2014). Fermented fruits and vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics. *Biotchnology Research International*, Hindawi Publishing Corporation, Volume 2014, Article ID 250424, 19pages

Swenson, T.M., Facklam, R.R., Thornsberry, C. (1990). Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactobacillus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 543-549.

T

Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 40,3: 722-756

Tahiri, I. (2007). Isolement et étude du potentiel de la divergicine m35, pour la bioconservation des produits marins prêts à consommer. Thèse de doctorat, Université Laval.

Takahashi, N., J.Z. Xiao, K. Miyaji, T. Yaeshiima, A. Hiramatsu, K. Iwatsuki, S. Kokubo and A. Hosono, (2004). Selection of acid tolerant *Bifidobacteria* and evidence for a low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy. Res.* 71:340-345.

Tamang, J.P. (2010d). Fermented cereals. In *Himalayan fermented foods: microbiology, nutrition, and ethnic values*. CRC Press, Boca Raton.

Tamine, A.Y et Robinson, R.K.(1999). *Yoghurt : Science Technology*. Woodhead Cambridge.

Tamime A.Y., (2002). Microbiology of starter cultures. In: *Dairy microbiology handbook* (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-36

Tanasupawat, S., Ezaki, T., Suzuki, K., Okada, S., Komagata, K., Kozaki, M. (1992). *J. General. Appl. Microbiol.* (38)121

- Tanasupawat, S., Thongsanit, J., Okada, K., Komagata, K. (2002). *J. General. Appl. Microbiol.* (48) 201-209
- Thapa, N., J. Pal and J.P. Tamang. (2006). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of eastern Himalaya. *Int. Food. Microbiol.*, 107: 33-38
- Tejero-Sariñena, S., J. Barlow, A. Costabile, G.R. Gibson, I. Rowland, (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*. 18 (5): 530-538.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food. Microbiol.* 81:1-10.
- Terzaghi, B.E. et Sandine, W.E. (1975). Improved medium for lactic *Streptococci* and their bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 29, 807-813
- Teuber, M. (1994). Lactic acid bacteria. *Biotechnology*, 1 :325-364.
- Thompson, J. (1987). Sugar transport in lactic acid bacteria. Sugar transport and metabolism in gram-positive bacteria. Editeurs Reizer J., Peterkofsky A., Ellis Horwood Ltd., Chichester, Royaume-Uni. 15-38.
- Thompson J., Gentry-Weeks C.R., (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). Lorica, Uriage. 1: 239-290.
- Titiek F.D., Endang S.R., Djoko W. & Slamet S. (1996): Antimicrobial substance produced by *Lactobacillus* sp. TGR-2 isolated from Growol. *Indonesia Food Nutrition Programme*. 3(2): 29-34.
- Todorov, S. D., and Dicks, L. M. (2004). Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 31: 323-329.

Toomey, N., Bolton, D. et Fanning, S. (2010). Characterization and transferability of antibiotic genes from lactic acid bacteria from Irish pork and beef abattoirs. *Res.Microbiol.*161: 127-135

Tossi,A., et Sandri,L.(2002). Molecular diversity in gene encoded, cationic antimicrobials polypeptides. 8(9):743-761.

Tosukhowong A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D. et Sonomoto K., (2005).Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. *J. Biosci.Bioengin.* 99: 30-37.

Tou, E.H., J.P. Guyot J.P., Mouquet-Rivier , C., Rochette,I.,Counil,E., Traoré, A.S., and Treche. (2006). Study through surveys and fermentation kinetics of the traditional processing of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) into ben-saalga, a fermented gruel from Burkina Faso. *International Journal of Food Microbiology* 106: 52–60.

Twomey, D., Ross, R. P., Ryan, M., Meaney, B., and Hill, C. (2002) Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek.*82: 165-185

Turpin, W. (2011).Vers une évaluation des potentialités probiotique et nutritionnelle des bactéries lactiques constitutives du microbiote d'un aliment fermenté à base de mil par une approche moléculaires. Thèse de doctorat, université de Montpellier 2 Sciences et Techniques du Languedoc, 169.

U

Udayakumar Nithya. (2009). Safe storage Guidelines for *Durum* wheat. Library &Archive. Canada; 104P

Upreti, G.C.,et Hinsdill, R.D.(1975).Production and mode of action of lactocin 27; bactericin from a homofermentative *Lactobacillus* .*Antimicrob.Agents Chemother.*7: 1 145-149

Usman, B. et Hosono, A. (1999). Bile tolerance taurocholate deconjugaison and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *J.Dairy Sci.*82:243-248

V

Van de Guchte, M., Ehrlich, S. D. et Maguin, E. (2001). Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Applied Microbiology* 91, 147-153.

Vasiljevic T., Shah N. P. (2008). « Probiotics - From Metchnikoff to bioactives ». *International Dairy Journal*. juillet 2008. Vol. 18, n°7, p. 714-728.

Vasquez C., Javier A., Casadei de Baptista G. , Gadanha J., Casimiro D. et Pimentel T., Luiz R. . (2008). Effet du volume de pulvérisation sur l'humidité du maïs entreposé et Grains de blé. *International Journal.*, vol. 51, pp 453-456.

Vollenweider, S. (2004). 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.* 64, 16-27.

Venugopal, H., Edwards, P.J.B., Schwalbe, M., Claridge, J.K., Libich, V.(2011). Structural, dynamic and chemical characterization of a novel S-glycosylated bacteriocin. *Biochemistry* 50(14), 2748-2755.

W

Wallace, T. D., Bradley, S., Buckley, N. D. & Green-Jonhson, J. H.(2003). Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. *Journal of Food Protection* 2003. Vol. 66 (3) : 466-472

Walsh, C. (2003). Natural and producer immunity versus acquired resistance Antibiotics: actions, originsn resistance. ASM Press, Washington, DC, pp 51-69.

Williams T. L., Andrzejewski D., Lay, J. O., Musser, S. M. (2003). Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI -TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14: 342–351.

Wilson, A. R., Sigeo, D. and Epton, H.(2005). Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic

acid production. Journal of Applied Microbiology 99, 1516-1522.

Wijtzes, T., Bruggeman, M., Nout, M., Zwwiering, M.(1997). A computerized system for the identification of lactic acid bacteria. J.Food.Microbiol, vvol,38n°1, p, 65-70

X

Xanthopoulos, V., Litopoulou- Tzanetaki, E.,Tzanetakis, N.(2000). Characterization of Lactobacillus isolated from infant faeces as dietary adjuncts, Food. Microbiology, 17(2):205-215

Y

Yao, A.A., M. Egounlety, L.P. Kouame, P. Thonard, (2009).Les bactéries lactiques dans les aliments ou les boissons amylicées de l'Afrique de l'Ouest : leur utilisation actuelle. Ann. Med. Vet., 153, 54-65.

Yateem,A.A., Balba, M.T. Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R.(2008). Isolation of acid lactic bacteria with probiotic potential from camel milk. Int.J. Dairy Sci, 3:194-199.

Yousif,N.M.K.,Huch,M.,Schuster,;T,Cho,GS.,Dirara,,H.A.,Holzapfel,W.H.,andFranz,C.M.A.P. (2010). Diversity of lactic acid bacteria from Hussuwa , a traditional African fermented sorghum food. Food.Microbiology 27, 757-768

Z

Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K.et Gill, H.S.(2005) Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains.Int.J.Food.Microbiol.98:211-217.

ANNEXES

Annexe 1**Milieux de cultures:****Milieu M17(Terzaghi et Sandine)**

Pour 1 litre de milieu :

Tryptone.....	2,50 g
Peptone pepsique de viande.....	2,50 g
Peptone papainique de soja	5,00 g
Extrait autolytique de levure.....	2,50 g
Extrait de viande	5,00 g
Lactose	5,00 g
Glycérophosphate de sodium	19,00 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Acide ascorbique	0,50 g
Agar agar bactériologique.....	15,00 g

pH 7,2

Stérilisation à 120°C pendant 20mm

Gélose MRS(pH 6,5)

Pour 1 litre de milieu :

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween80.....	1ml
Phosphatebipotassique	2g
Acétate de sodium5g
Citrate d'ammonium2g
Sulfate de magnesium, 7 H2O	0.2g
Sulfate de manganèse, 4 H2O.....	0.5g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Milieu MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962).

Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
Sccharose	100g
Glucose	5g
Citrate de sodium	1g
Gélatine	2,5g
Azide de sodium	0.0075g
Eau distillée qsp	1000ml
Agar	15g

pH7

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20minutes

Lait écrémé « Candia Silhouette »

Utilisé pour la préparation du milieu de Sherman

Lait écrémé	100g
Eau distillé.....	1000 ml

Autoclave 120°C pendant 10 minutes

Lait bleu de Sherman :

Lait écrémé.....	100ml
Bleu de méthylène à 1%	1ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 10minutes

Solution tampon

La solution tampon est obtenue par le mélange de deux solutions A et B

Solution A

KH_2PO_4 5,44g

Eau distillée 200ml

Solution B

Na_2PO_4 11,36g

Eau distillée 400ml.

Annexe 2

Tableau 17 : Résultat de l'acidité produite par les souches lactiques durant 24h

	0h		2h		4h		6h		24h	
	pH	D°	pH	D°	pH	D°	pH	D°	pH	D°
BHC6	6.67	12,5	6.42	15,5	6.42	23	6.31	26,5	5.21	53
BHL8	6.67	12,5	6.54	16	6.45	17	6.33	18	6,05	37
BHL23	6.67	12,5	6.49	16,7	6.47	22	6.4	26	5.8	43
BHL27	6.67	12,5	6.48	15,3	6.44	17	6.4	20	6,2	29

Tableau 18 : Interactions entre genre des bactéries lactiques en milieu solide

Ind	Inh	<i>Lb plantarum</i>											<i>Lb brevis</i>		
		BHL1 2	BHL 13	BHL 14	BHL1 5	BHL 16	BHL1 7	BHL 18	BHL 19	BHL 20	BHL 21	BHL 22	BHL 1	BHL 2	BHL 3
<i>Lb plantarum</i>	BHL1 2	10,0	12,0	5,0	10,0	0,0	9,0	9,0	10,0	9,0	8,0	8,0	9,0	15,0	0,0
	BHL1 3	10,0	9,0	12,0	0,0	0,0	12,0	7,0	12,0	10,0	10,0	11,0	10,0	15,0	0,0
	BHL1 4	10,0	10,0	10,0	5,0	15,0	10,0	5,0	11,0	10,0	10,0	11,0	5,0	5,0	12,0
	BHL1 5	8,0	10,0	10,0	12,0	12,0	7,0	7,0	11,0	10,0	11,0	12,0	10,0	12,0	15,0
	BHL1 6	7,0	16,0	5,0	0,0	5,0	6,0	9,0	10,0	11,0	13,0	14,0	10,0	12,0	16,0
	BHL1 7	10,0	17,0	8,0	15,0	12,0	5,0	10,0	12,0	11,0	5,0	5,0	10,0	10,0	17,0
	BHL1 8	10,0	16,0	9,0	0,0	7,0	12,0	10,0	10,0	9,0	10,0	10,0	10,0	15,0	0,0
	BHL1 9	12,0	15,0	10,0	0,0	8,0	5,0	11,0	13,0	9,0	12,0	5,0	5,0	0,0	0,0
	BHL2 0	8,0	16,0	7,0	11,0	9,0	0,0	11,0	12,0	11,0	12,0	10,0	6,0	10,0	10,0
	BHL2 1	9,0	17,0	5,0	10,0	6,0	12,0	10,0	13,0	12,0	11,0	11,0	5,0	0,0	5,0
	BHL2 2	12,0	16,0	6,0	6,0	7,0	0,0	12,0	10,0	12,0	12,0	12,0	6,0	10,0	0,0
<i>Lb brevis</i>	BHL 1	5,0	7,0	8,0	5,0	5,0	5,0	0,0	0,0	7,0	0,0	5,0	6,0	10,0	5,0
	BHL 2	0,0	0,0	7,0	6,0	5,0	0,0	0,0	0,0	9,0	0,0	5,0	7,0	9,0	8,0
	BHL 3	5,0	0,0	0,0	7,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	6,0	5,0	10,0	7,0	5,0

Lb: *Lactobacillus*; Ind : indicatrice ; Inh: inhibitrice

Les diamètres des zones d'inhibitions sont exprimés en mm

Tableau 18a

Ind		<i>Lb amylophilus</i>								<i>Lb casei</i>				
Inh		BHL 4	BHL 5	BHL 6	BHL 7	BHL 8	BHL 9	BHL 10	BHL 11	BHL2 3	BHL2 4	BHL2 5	BHL2 6	BHL2 7
<i>Lb amylophilus</i>	BHL4	12,0	15,0	4,0	6,0	6,0	7,0	15,0	6,0	12,0	7,0	20,0	16,0	13,0
	BHL5	15,0	4,0	5,0	7,0	10,0	10,0	16,0	9,0	12,0	15,0	16,0	15,0	5,0
	BHL6	6,0	17,0	5,0	12,0	6,0	7,0	11,0	12,0	10,0	7,0	15,0	9,0	7,0
	BHL7	7,0	15,0	16,0	6,0	9,0	8,0	16,0	5,0	15,0	8,0	9,0	5,0	8,0
	BHL8	15,0	15,0	17,0	9,0	7,0	9,0	10,0	9,0	10,0	12,0	5,0	6,0	9,0
	BHL9	14,0	16,0	10,0	5,0	12,0	16,0	15,0	9,0	12,0	14,0	10,0	12,0	10,0
	BHL10	9,0	12,0	10,0	10,0	12,0	7,0	12,0	6,0	14,0	14,0	11,0	11,0	11,0
	BHL11	10,0	10,0	24,0	10,0	5,0	14,0	15,0	15,0	10,0	12,0	15,0	16,0	17,0
<i>Lb casei</i>	BHL23	5,0	7,0	8,0	0,0	11,0	15,0	5,0	6,0	7,0	10,0	0,0	0,0	0,0
	BHL24	8,0	6,0	9,0	5,0	12,0	10,0	12,0	15,0	8,0	5,0	0,0	0,0	0,0
	BHL25	0,0	10,0	9,0	8,0	15,0	15,0	5,0	9,0	9,0	5,0	4,0	5,0	0,0
	BHL26	6,0	0,0	0,0	9,0	10,0	12,0	9,0	10,0	10,0	0,0	5,0	5,0	10,0
	BHL27	5,0	10,0	10,0	11,0	10,0	10,0	10,0	12,0	10,0	0,0	0,0	0,0	5,0

Tableau 18b.

Ind		<i>Pediococcus</i>						<i>Enterococcus</i>			<i>Leuconostoc</i>		
Inh		BHC 4	BHC 5	BHC 6	BHC 7	BHC 8	BHC 9	BHC 1	BHC 2	BHC 3	BHC 10	BHC 11	BHC 12
<i>Lb plantarum</i>	BHL12	4,0	6,0	7,0	0,0	0,0	0,0	10,0	16,0	10,0	9,0	6,0	9,0
	BHL13	5,0	0,0	8,0	0,0	0,0	0,0	5,0	4,0	4,0	6,0	8,0	6,0
	BHL14	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,0	5,0	5,0	8,0	8,0	0,0
	BHL15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,0	4,0	0,0	4,0	6,0	6,0	6,0
	BHL16	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	8,0	5,0	15,0	4,0	9,0	9,0	9,0
	BHL17	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	7,0	9,0	5,0	7,0	7,0	8,0	8,0
	BHL18	5,0	6,0	7,0	0,0	0,0	7,0	8,0	9,0	10,0	8,0	8,0	7,0
	BHL19	5,0	7,0	5,0	0,0	5,0	6,0	0,0	16,0	9,0	10,0	7,0	5,0
	BHL20	4,0	8,0	5,0	4,0	5,0	5,0	7,0	17,0	6,0	9,0	9,0	8,0
	BHL21	5,0	8,0	4,0	5,0	5,0	6,0	5,0	12,0	7,0	8,0	8,0	8,0
	BHL22	5,0	8,0	4,0	5,0	5,0	5,0	4,0	9,0	8,0	7,0	7,0	6,0

Lb: *Lactobacillus* ; Ind : indicatrice ; Inh: inhibitrice

Les diamètres des zones d'inhibitions sont exprimés en mm

Tableau 18c

Ind		<i>Lb casei</i>					<i>Leuconostoc</i>		
Inh		BHL23	BHL24	BHL25	BHL26	BHL27	BHC 10	BHC 11	BHC 12
<i>Lb plantarum</i>	BHL 17	6,0	6,0	7,0	9,0	10,0			
	BHL 18	11,0	12,0	15,0	7,0	8,0			
	BHL 19	12,0	11,0	9,0	7,0	8,0			
	BHL 20	5,0	0,0	4,0	5,0	4,0			
	BHL 21	5,0	0,0	0,0	10,0	10,0			
	BHL 22	6,0	7,0	6,0	0,0	10,0			
	BHL 23	7,0	4,0	7,0	7,0	0,0			
	BHL 24	8,0	5,0	6,0	6,0	8,0			
	BHL 25	8,0	7,0	12,0	7,0	9,0			
	BHL 26	6,0	6,0	12,0	9,0	12,0			
	BHL 27	6,0	6,0	11,0	10,0	9,0			
<i>Leuconostoc</i>	BHC 10	0,0	9,0	7,0	8,0	0,0	6,0	7,0	6,0
	BHC 11	10,0	0,0	7,0	8,0	6,0	8,0	7,0	6,0
	BHC 12	11,0	8,0	8,0	9,0	7,0	9,0	7,0	6,0

Lb: *Lactobacillus* ; Ind : indicatrice ; Inh: inhibitrice

Les diamètres des zones d'inhibitions sont exprimés en mm

Tableau 18d

Ind		<i>Lb casei</i>					<i>Enterococcus</i>			<i>Leuconostoc</i>		
Inh		BHL23	BHL24	BHL25	BHL26	BHL27	BHC 1	BHC 2	BHC 3	BHC 10	BHC 11	BHC 12
<i>Lb brevis</i>	BHL1	10	6,0	6,0	7,0	6,0	15,0	16,0	6,0	10,0	5,0	6,0
	BHL 2	15	10,0	6,0	6,0	0,0	15,0	16,0	10,0	10,0	5,0	8,0
	BHL 3	6	6,0	6,0	13,0	15,0	16,0	16,0	7,0	7,0	7,0	7,0

Lb : *Lactobacillus*,; Ind : indicatrice ; Inh: inhibitrice .

Les diametres des zones d'inhibitions sont exprimés en mm

Tableau 18e

Ind		<i>Lb plantarum</i>										
Inh		BHL12	BHL13	BHL14	BHL15	BHL16	BHL17	BHL18	BHL19	BHL20	BHL21	BHL22
<i>Pediococcus</i>	BHC 4	4,0	0,5	10,0	6,0	0,4	9,0	0,4	0,5	0,6	0,6	0,5
	BHC 5	5,0	6,0	10,0	0,5	0,5	6,0	0,5	0,5	0,7	0,7	0,6
	BHC 6	9,0	10,0	9,0	0,4	0,6	7,0	0,5	0,5	0,7	0,5	0,7
	BHC 7	5,0	0,5	9,0	0,5	0,5	6,0	0,6	8,0	8,0	0,6	0,6
	BHC 8	8,0	0,6	16,0	0,6	0,6	5,0	0,7	7,0	6,0	0,5	0,5
	BHC9	9,0	10,0	11,0	12,0	9,0	6,0	6,0	6,0	8,0	8,0	7,0

Tableau 18f

Ind	Inh	<i>Lb. amylophilus</i>								<i>Lb brevis</i>			<i>Lb casei</i>					
		BHL 4	BHL 5	BHL 6	BHL 7	BHL 8	BHL 9	BHL 10	BHL 11	BHL 1	BHL 2	BHL 3	BHL 12	BHL 13	BHL 14	BHL 15	BHL 16	
<i>Pediococcus</i>	BHC 4	4,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	5,0	5,0	4,0	7,0	6,0	7	4	0	4	6	
	BHC 5	5,0	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	4,0	5,0	5,0	6,0	5,0	7	4	0	6	7	
	BHC 6	0,0	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	5,0	5,0	6	5	0	5	6	
	BHC 7	0,0	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	5,0	7,0	6,0	6,0	6	5	0	5	5	
	BHC 8	5,0	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5	5	0	7	5	
	BHC 9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4	5	0	7	5	

Lb : *Lactobacillus*,; Ind : indicatrice ; Inh: inhibitrice .

Les diametres des zones d'inhibitions sont exprimés en mm

Tableau 19 : Activité antagoniste inter-bactérienne en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

S.Ind	BHC5		BHC4		BHC 12		BHL6		BHL 7		BHL9		BHL21	
MILIEU S.Inh	MRST	MRSN T	MRST	MRSN T	MRST	MRSN T	MRST	MRSN T	MR ST	MRSN T	MRST	MRSN T	MRST	MRS NT
BHL 3	9	11	5	12	10	9	7	13	5	10	5	12	5	10
BHL 8	12	12	0	14	0	0	6	9	11	10	11	10	8	10
BHL11	0	10	0	7	7	6	7	10	10	5	5	10	0	0
BHL13	9	8	10	12	8	8	0	9	10	8	6	7	9	8
BHL 17	7	14	10	12	9	13	10	12	12	13	8	14	10	12
BHL 18	7	6	10	7	0	12	7	10	11	9	10	10	10	7
BHL 22	11	12	11	15	10	10	9	12	11	11	10	13	10	10
BHL 23	12	19	7	14	10	12	12	15	11	12	11	13	6	12
BHL 24	0	0	0	0	0	0	5	7	4	8	5	6	4	5
BHL25	0	12	0	6	4	10	6	10	0	0	5	8	4	6
BHL27	7	22	7	15	9	16	10	19	17	21	7	13	8	12
BHC 4	0	9	0	6	8	7	7	10	7	11	7	11	7	11
BHC6	9	11	9	6	8	6	7	11	7	10	6	10	7	7
BHC10	10	11	10	9	7	11	10	13	8	11	10	8	9	10

S. Ind : souche indicatrice ; S. Inh: souche inhibitrice

Les diamètres sont mesurés en m

Tableau 20 : Résultat des interactions des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries pathogènes

S.Ind S.Inh	<i>Pseudomonasaeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	MRS N T	MRS T	MRS NT	MRS T	MRS NT	MRS T
BHC1	10	9	16	7	10	5
BHC2	12	10	12	8	10	0
BHC3	13	7	15	0	7	4
BHC4	12	10	5	12	11	0
BHC5	11	9	10	0	10	9
BHC6	20	0	20	15	23	16
BHC7	5	4	0	0	12	10
BHC8	8	5	12	9	12	0
BHC9	15	12	12	0	7	9
BHC10	12	11	0	0	10	0
BHC11	11	9	10	9	12	10
BHC12	9	10	14	0	13	10
BHL1	22	23	14	10	8	10
BHL2	21,5	22	10	0	15	17
BHL3	22	19	20	15	20	18
BHL4	18,5	17	15	11	16	12
BHL5	23,5	20	0	0	13	10
BHL6	20,5	10	16	10	14	15
BHL7	21	19	10	0	16	20
BHL8	20,5	12	16	10	22,5	16
BHL9	5	11	20	10	12	9
BHL10	21	18	12	9	15	10
BHL11	24	16	18	20	19	11
BHL12	0	0	10	6	11	0
BHL13	15	13	8	15	16	14
BHL14	12	10	15	10	15	12
BHL15	0	0	12	9	12	10
BHL16	0	0	14	10	13	9
BHL17	0	0	12	9	16	18
BHL18	0	0	15	5	12	16
BHL19	0	0	6	10	14	10
BHL20	0	0	11	9	15	18
BHL21	17	18	12	10	11	9
BHL22	16	15	12	9	20	15
BHL23	18	16	18	9	10	9
BHL24	15	18	12	10	11	10
BHL25	14	15	12	10	9	11
BHL26	20	18	16	14	10	14
BHL27	19	10	17	0	20	15

La mesure des halos d'inhibitions est exprimée en mm.

S.ind : souche indicatrice ; S.inh: souche inhibitrice

Tableau 21 : Activité antagoniste des souches lactiques en milieu tamponné (T) et non tamponné (NT).

Milieu	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>E.coli</i>	
	T	NT	T	NT	T	NT
BHC6	0	20	16	23	15	20
BHL8	12	20,5	16	15	10	16
BHL23	16	18	9	10	9	18
BHL27	10	19	15	20	0	17

La mesure des halos d'inhibitions est exprimée en mm.

Tableau 22 : Effet inhibiteur des souches lactiques en présence d'enzymes (mm).

S.Ind S.Inh	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	Tryp sin e	α - chymotryp sine	Catala se	Trypsi ne	α - chymotryp sine	Catala se	Trypsi ne	α - chymiotryp sine	Catala se
BHC6	0	0	7	0	0	6	0	0	9
BHL8	0	0	6	0	0	7	0	0	6
BHL23	0	0	8	0	0	8	0	0	8
BHL27	0	0	8	0	0	8	0	0	8

La mesure des halos d'inhibitions est exprimée en mm.

Tableau23 : Resultat du stress acide sur les souches lactiques

Souches bactériennes	pH		
	2,5	4,5	6,5
BHL 8	63,6	80,01	92,21
BHL 23	98	104,06	100,7
BHLC 6	92,33	92,45	96,2
BHL 27	99,41	100,2	98,9

Tableau 24 : Resultatde la tolérance des sels biliaries sur les souches lactiques.

	Concentrations en sels biliaries (%)							
	0		0.3		0.5		1	
	pH 2,5	pH6,5	pH 2,5	pH 6,5	pH2,5	pH 6,5	pH2,5	pH6,5
<i>Lb.plantarum</i>	96,2	98	96,6	98,5	96,5	96,7	88,1	96,9
<i>Lb.plantarum</i>	97,3	95	112,45	99,8	99,18	91,16	97,51	98,8
<i>Lb. brevis</i>	98,7	92,6	97,05	98,6	95,4	123,3	96,34	96,8
<i>P. acidilactici</i>	92,05	91,6	101,8	100,03	87,52	99,82	93,54	98,62