



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N° _____/SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle NEGADI Nour-El-HOUDA

Mlle MEKELLECHE Amina

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN (BIOLOGIE)

Spécialité: BIOTECHNOLOGIE DES MICROORGANISMES

THÈME

*Isolement et identification de certaines souches de
bactéries lactique de l'orge de la région de Hadjadj
(Willaya de Mostaganem)*

Soutenu publiquement le 04/06/20117

Devant le Jury

Président	M. CHADLI R	M.C.B U. Mostaganem
Rapporteur	M. BENAKRICHE B M	M.C.B. U. Mostaganem
Examineur	M. BEKKADA A	M.C.B. U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de microbiologie N°0 3

Année universitaire : 2016/2017

Remerciement :

Je remercie tout d'abord ALLAH le tout miséricordieux, le très miséricordieux, louange à vous qui nous inculqué la force nécessaire et le courage pour mener à bien ce travail. Nous vous prions de nous aider d'avantage à percer dans la recherche du savoir.

Notre prophète MOHAMMED, que la bénédiction d'Allah soit sur lui, sa famille, ses compagnons et tous ceux qui le suivent sur le droit chemin jusqu'au dernier jour. Puisse Allah nous guider sur vos pas.

Je remercie également M.BENAKRICH B.M pour son aide et les conseils, qu'elle m'a apporté tout au long de ce travail.

Je tien à remercie aussi M. BEKADA A pour avoir accepté d'examiner mon travail. Leurs commentaires lors de la soutenance seront utile pour moi.

Mes vifs remerciements à M. CHADLI R de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je tiens à remercie les techniciens de laboratoire de microbiologie a l'université de Mostaganem pou l'aide qui m'ont apporté en particulier M. Djilali.

Et mes remerciements également à toutes les personnes qui ont continué de prés ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

A mes chères et magnifiques mamans (chère grand-mère et ma mère) qui m'ont soutenu tout au long de ma vie, vos conseils m'ont permis d'attendre le but désiré. Que dieu, le tout puissant, vous comble de santé, de bonheur, de prospérité et vous accorde une longue vie.

A mes chères frères : MOLOUD, MOURAD, KARIM, RIADH, MOHAMMED.

A mes chères sœurs : MENINA, NAIMA, RANYA, AYA.

A mes chers neveux : MARIA, NADINE, HAMZA, RYAN, OMAR, IBRAM, KHALIL.

A mon binôme AMINA

A toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à la réalisation de ce modeste travail.

Negadi Nour-El-Houda

Introduction

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutiques de la plupart des aliments utilisés de façon empirique depuis des millénaires. Ce savoir traditionnel ancestral transmis de génération en génération est devenu aujourd'hui une mine d'information extrêmement précieuse pour tous les chercheurs.

Les céréales jouent un rôle nutritionnel, social et économique important, elles constituent depuis toujours la majeure source alimentaire de l'homme. Parmi les céréales les plus consommées et cultivées dans le monde : l'orge, la principale source de protéines végétales dans l'alimentation humaine (**Multon, 1982; Molinié et Pfohl-Leszhowicz., 2003**).

L'orge commune (*Hordeum vulgare*) est une céréale à paille, plante herbacée annuelle. Elle fait partie des plus anciennes céréales cultivées. Bien adaptée au climat méditerranéen du fait de sa rusticité, elle constituait ainsi la principale céréale cultivée dans l'Antiquité grecque et était consommée sous forme de galette ou de bouillie (maza).

L'orge est la céréale la plus consommée à travers le monde. Il s'adapte à des climats variés. La production de l'orge est très importante, sa culture est présente dans presque toutes les régions (**Jeantet et al., 2007**).

Concernant notre travail, on a choisi l'orge de type «*Hordeum vulgare*» parmi les aliments qui est le moins consommé dans notre pays. Hormis, son utilisation dans l'industrie traditionnelle de la bière, il est consommé artisanalement comme aliment diététique dans notre société. Notamment contre certaines complications physiopathologiques comme le diabète, le ballonnement. Récemment, il a été montré en Tunisie que l'orge de la variété Rihane diminue l'initiation de la carcinogénèse chez le rat Wistar (Kermiche ; 2013), ceci pourrait éviter les effets secondaires de la chimiothérapie chez les patients. Et donc, le retour à la consommation des produits biologiques du terroir serait plus judicieux.

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie (**Bekhouche et Boulahrouf., 2005**). Elles peuvent tenir parmi les plus d'importants groupes de micro-organismes utilisés dans les fermentations alimentaires (**Hikmate et al., 2012**). La propriété des bactéries lactiques à produire des composés antagonistes tels que les acides organiques, qui font baisser le pH dans le milieu, et par la synthèse de bactériocines qui renforce la conservation (**Bekhouche et Boulahrouf., 2005**) est reconnue depuis très longtemps. Par cette capacité, l'utilisation des bactéries lactiques permet de satisfaire les besoins de point de vue sanitaire en

Introduction

industrie alimentaire, et permet d'inhiber la prolifération des microorganismes pathogènes et ainsi d'assurer une bonne conservation des aliments (**Paul Ross *et al.*, 2002**).

L'intérêt de cette étude est d'identifier et de caractériser des bactéries lactiques isolées à partir de l'orge de type «*Hordeum vulgare*» provenant de la région de Hadjadj de la wilaya de Mostaganem.

b)- facteur extrinsèques :

_ L'eau :

Une semence ne peut germer qu'à partir du moment où elle a atteint un certain seuil de teneur en eau .pour le blé, elle est de 24% (BOIFFIN J 1990).

_ La température :

La température stimule les activités enzymatiques et ainsi la vitesse de germination (LAFONT J ; P ; et al.1988).

SIMON H 1989 définit une température minimale à laquelle un grain est capable de germer ; c'est le seuil thermique ou le zéro de germination .pour l'orge, elle est voisine de 0°C cependant, la levée de cette céréale est plus rapide que celle du blé.

_ l'oxygène :

D'après LAFONT J.P (1988) seul l'oxygène dissous dans l'eau d'imbibition est utilisée par l'embryon pour ses besoins métaboliques. Lors du semis, la concentration en oxygène au niveau de la semence est égale à celle de l'air atmosphérique, c'est-à-dire environ 21%.

Si la concentration en oxygène diminue, la semence peut se trouver en condition dite<<hypoxique>> et sa germination peut être ralentie voire inhibée, (RICHARD G et BOIFFIN J ,1990)

_ Un lit de semence :

Doit être soigneusement préparé : pas trop tassé pour provoquer l'état d'hypoxie, et pas trop poreux pour couper la remontée capillaire .les grains doivent être bien en contact avec les particules du sol pour faciliter leur réhydratation.

_ La profondeur de semis :

Est de 2à3 cm pour les céréales à pailles, un semis profond retarde et réduit la levée par épuisement des réserves .c'est à cause d'apparition de condition anoxique ou le rencontre d'obstacles offrant une résistance mécanique supérieure à la poussée d'une plantule en croissance, peuvent entraîner la mort de la plantule.

B)- phase levée-début tallage :

Lorsque la première feuille perçant le coléoptile est à demi développement ,la pointe de la deuxième feuille commence son émergence ,un peu plus tard la troisième feuille les succède ,en même temps on peut distinguer par transparence à travers le coléoptile un filament terminé par un renflement qui va se gonfler pour former la plaque de tallage PRATTS J (1971).



	Début tallage	Plein tallage	Fin tallage
Zadoks	21	26	30
keller et Baggioloni	E	F	H
Feekes et Large	2	3	4

Figure : phase levée au tallage

Lorsque la troisième ou quatrième feuille, se forme le plateau de tallage .c'est la période du tallage proprement dite, c'est la plus importante du cycle de l'orge au cours de laquelle les bourgeons axillaires entrent en croissance à des tiges secondaires (talles) avec développement des racines adventives, c'est la fin de la période végétative.

_ Période reproductrice :

C'est la période de reproduction qui correspond aux stades gonflement, épiaison et floraison.

Figure : la phase d'épiaison

_ Période de maturation :

D'après SOLTANER(1990), la maturité correspond à l'accumulation de l'amidon dans un grain puis à leur perte d'humidité

Le grain ne perd que l'excès d'eau qu'il contient. Il passera du stade <<pâteux>> 45% d'humidité au stade <<rayable à l'ongle>>20%, stade optimum pour une récolte à la lieuse, puis au stade <<cassant sous la dent>> (15-16%). Il est alors mur pour la récolte à la moissonneuse-batteuse (SOLTANER, 1990).

Elle se traduit par l'évolution du grain en **trois phases** :

a) phase de multiplication cellulaire intensive :

Comme il n'y a plus des feuilles et des tiges, la matière sèche synthétisée dans les feuilles est entièrement destinée à l'accumulation des réserves, c'est le stade <<grain laiteux>>.

b) phase d'accumulation des réserves :

Le grain encore chlorophyllien accumule ses réserves amylicées protidiques. Son poids de matière sèche atteint progressivement son maximum, tandis que le poids d'eau dans le grain demeure constant ; c'est le palier hydrique c'est le stade grain pâteux (SIMON H 1989).

c) phase de dessiccation :

Le grain perd progressivement son eau pour atteindre un taux d'humidité de 15-16%, c'est le stade grain dur ou cassant.

_ Exigences climatique et édaphique de l'orge :

_ Exigence climatique :

_ L'eau :

L'eau de constitution, celle qui entre dans la composition des tissus pour 75 à 90% ne représente qu'un poids limité de la globale estimés à 450-500 mm pour produire 40 quintaux

L'eau de végétation au contraire, celle qui puisée par les racines, traverse la plante avant d'être rejetée dans l'atmosphère par les feuilles, représente en moyenne 520 litre par kilogramme de matière sèche élaborée.

Il faudra donc veiller à la bonne exploitation du sol par les racines. Ceci explique l'importance de la préparation des terres destinées à l'orge par des labours précoces permettant l'accumulation des réserves d'eau des pluies hivernales, spécialement dans les zones (sols et climats) sèches.

La valorisation de l'eau paraît passer par les irrigations de compléments. Selon HENNI S et REHAB A (1994). Cette méthode et la plus adaptée, à terme, à résoudre les problèmes tout à la fois de sécheresse aléatoire, et de croissance de la densité de population : elle permet d'assurer et de régulariser la production. Le nombre de grain par épi et le poids des grains sont augmentés.

_ La température :

L'énergie thermique reçue par les plantes est très importante dans la régulation du processus de mise à fleur, sa variation conditionne leur rythme de développement et leur vitesse de croissance

Le zéro de germination de l'orge est variable de 0°C. Selon le génotype, la latitude et le climat, l'orge d'hiver a un cycle germination-maturité de 210 à 270 jours, donc des sommes de températures de 1900 à 2000 degrés jours (VILAIN M et REHAB A 1994).

Le cycle germination-maturité de l'orge de printemps n'est que de 90 à 150 jours, avec des sommes de température de 155 à 1700 degrés jours suivant les besoins en froid, les variétés d'orge sont classées en trois principaux types :

- _ Type hiver
- _ Type printemps
- _ Type alternatif

Les variétés de type hiver demandent un abaissement de la température (vernalisation)

En début de végétation, de 3 à 7 semaines. Cette exigence conditionne la montaison et la formation de fleurs (SIMON H 1989).

_ La lumière :

Une certaine durée du jour (photopériodisme) est nécessaire pour la réalisation du stade précédent la montaison (SOLTNER D, 1990).

Si la vernalisation est un processus qui prépare à plus ou moins longue échéance, à la floraison (induction florale), le photopériodique de la floraison (initiation florale) (KHALDOUN A 1989).

Alors que l'intensité lumineuse provoque l'initiation des feuilles sur le méristème apicale, les jours long, accélèrent leur croissance (ASPINALL et PALEG 1963 ; KHALDOUN A 1986).

Chaque variété possède à ce sujet des exigences photostadiales propres, qui n'étant pas absolues, sont susceptibles de varier avec l'âge, la température et les conditions, nutritionnelles (BOUGHIDA D 1992). Hormis le besoin éventuel en vernalisation, l'orge est une espèce dite de jours longs.

_ Exigence édaphique :

L'orge donne évidemment les meilleurs résultats dans les meilleures terres, mais elle tire encore une bonne partie des terres minces et caillouteuses. Les terres calcaires légères et aérées conviennent bien à l'orge d'hiver (PARTS J ,1971).

Les précédents cultures ont une influence indiscutable sur le niveau du parasitisme, sur les travaux nécessaires à effectuer, sur la fertilisation de la culture en cours (BELAID D ,1990).

L'orge généralement, est moins sensible à l'espèce de la céréale précédente. Bien qu'il soit contre indiqué après orge en saison de leur sensibilité au piétin. Sa répétition est tolérée par rapport à la répétition des autres céréales. Sa place normale est après un blé (PRATS J ,1971).

On estime la quantité d'azote moyenne nécessaire pour produire un quintal de grains d'orge d'hiver ou d'escourgeon à 2,5 unités d'éléments fertilisants (VILIAN M 1989). L'alimentation azotée importante favorise le tallage herbacé mais pas le tallage épi (SIMON H et al, 1989).

Les quantités de fumure phosphatée et potassique exportées par l'orge :

_ Chaque quintal de grain récolté exporte 0,8 kg d'anhydride phosphorique (P₂O₅) et 0,7 kg de potassium(K₂O).

_ Chaque tonne de paille récoltée exporte 2kg d'anhydride phosphorique (P₂O₅) et 1,4kg d'oxyde de potassium(K₂O).

Une orge qui produit 50 quintaux de grain par hectare et 4 tonnes de paille, elle exporte 48kg/ha de P₂O₅ et 91kg/ha de K₂O.

En taire calcaire, il convient de majorer la fumure P et K et aussi dans les sols doués d'un grand pouvoir fixateur ou au contraire qui l'est exposent à des pertes par lessivage (BELAID DJ ,1986).

_ Différentes utilisation de l'orge :

_ Utilisation de l'orge en alimentation animale :

Les cultures fourragères prennent de plus en plus d'importance ces dernières années. Cela est dû à la résorption de la jachère.

Par ailleurs cette tendance est encouragée par la forte rentabilité de la production animale (BELAID DJ 1986). Signalons que les productions en fourrages en Algérie ne satisfont pas les besoins en protéines et énergétique du cheptel.

Divers travaux menés en Tunisie et en Algérie ainsi que les observations réalisées sur la daïra de Tissemsilt ont montré le rôle important de la mise en place des cultures fourragères et l'opération de la récolte et leur effet sur la qualité des fourrages pour la détermination de l'acceptabilité (quantité de la matière sèche ingérée par l'animal) et de sa valeur nutritive (BELAID DJ 1986).

_ Exploitation de l'orge en vert :

On récolte l'orge à un stade herbacé pour une consommation directe ou sous forme ensilée. L'ensilage de l'orge permet de combler le déficit alimentaire pendant les saisons de faible pâturage (été et automne).

Pour l'orge le meilleur stade de récolte est quand les plantes commencent à jaunir et le grain est au stade pâteux la haute valeur nutritive du grain compense la faible valeur alimentaire des tiges fibreuses.

Les variétés d'orge diffèrent de par leur digestibilité et leur rendement en matière sèche au moment de l'ensilage.

L'orge peut être également utilisée en association avec des légumineuses fourragères telles que la vesce et le pois fourrages pour le mélange vesce orge. La présence de barbes diminue fortement l'acceptabilité du fourrage.

Le pâturage de l'orge en vert ou pacage apparaît comme le système d'utilisation le plus rationnel.

_ exploitation de l'orge en grain :

L'orge est la première céréale fourragère en Algérie, elle est parmi <<les grandes cultures>> la plus consommée à la ferme quelque soit le type d'élevage. La motivation de levageur qui pratique l'autoconsommation est d'accroître la rentabilité de l'élevage en abaissant le cout de l'approvisionnement et d'autre part d'apporter une valeur ajoutée à sa production végétale.

_ Utilisation de l'orge en alimentation humaine :

L'orge n'a pas d'emploi courant dans l'alimentation de l'homme, on la trouve tantôt à l'état de semoule, plus ou moins grossière renferment une proportion de débris de péricarpe, tantôt à l'état de farine et blanche. Le pain d'orge à la particularité de donner une patte friable et sans cohésion, il servait d'alimenter de base pour les paysans pendant la colonisation.

En biscuiterie, son emploi est restreint, surtout en raison de la teinte gris-verdâtre qu'elle donne souvent aux produit cuits à la levure chimique.

_ Utilisation de l'orge en brasserie :

Le malt c'est un produit résultant de la germination de l'orge ce n'est pas un produit fini, il est utilisé pour la fabrication da la bière est utilisé pour la fabrication d'aliment diététiques. On lui attribue aussi plusieurs usages alimentaires tels que les sirops de malt employés dans les sucreries, les boissons les gateaux ainsi que les utilisations en pharmacie

Le malt contient les éléments suivants :

- amidon (C₆H₁₀ O₆).....58%
- sucres réducteurs04%
- saccharose05%
- pentosane, rexonanes insoluble09%
- cellulose.....06%
- matière azotées.....10%
- matières minérales.....2,5%
- matières grasses.....2,5%

Chapitre II
Les bactéries lactiques

1. Généralités

Les bactéries lactiques sont très anciennes et sont apparues avant les cyanobactéries, il y a près de 3 milliards d'années (Tailliez, 2001). Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des millénaires dans l'alimentation humaine (Penaud, 2006). La découverte de leur action fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de levains, simple récupération d'une partie du milieu de fermentation.

La première culture pure était des *Bacterium lactis* probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par Lister en 1873 (Ho, 2008). Les bactéries lactiques ont été isolées pour la première fois à partir du lait (Metchnikoff, 1908; Sandine *et al.*, 1972; et Carr *et al.*, 2002). Les bactéries lactiques sont définies comme des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (De Roissart, 1986).

2. Caractéristiques principales des bactéries lactiques

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par Orla-Jensen (1919) et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (Novel G., 1993).

Les bactéries lactiques colonisent de nombreux produits alimentaires tels que les produits laitiers, la viande, les végétaux, et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (Dortu & Thonart, 2009). Elles sont un groupe de bacilles ou coccobacilles ont pour principales caractéristiques d'être : à Gram positif, généralement immobiles, asporulés, anaérobies mais aérotoles, dépourvus de cytochromes-oxydase et de nitrate-réductase, ne possède pas le catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase) (Dellaglio *et al.*, 1994 ; Carr *et al.*, 2002 ; Axelsson, 2004).

Pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles) et de nombreuses bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras (Prescott *et al.*, 1999).

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme fermentaire. Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les bactéries lactiques sont dites :

- Homofermentaires : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose

- Hétérofermentaires facultatif : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique ou de l'acide lactique et de l'acide acétique
- Hétérofermentaires strict : elles produisent, en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂

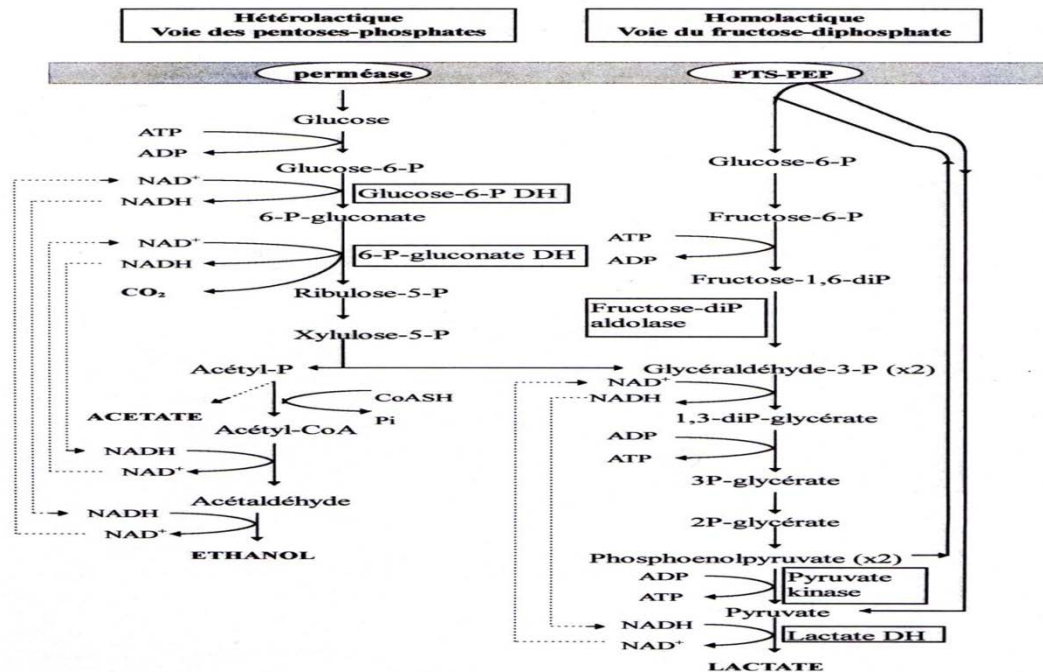


Figure 12. Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques (Desmazeud et De Roissart, 1994).

Beaucoup de ces caractères sont typiques et servent à définir le « cœur » du groupe lactique que les recherches taxonomiques et phylogéniques (ou phylogénétiques) sont en train de modifier de façon significative, soit au niveau des genres et des espèces, soit au niveau de la ligne de démarcation avec d'autres groupes de bactéries (Dellaglio *et al.*, 1994).

3. Classification des bactéries lactiques

La systématique est en évolution permanente. Il n'y a jamais eu de règles unanimement reconnues sur la façon dont deux bactéries différentes devraient être phénotypiquement classées. Par exemple, quelles caractéristiques sont importantes dans la définition des sous-espèces, des espèces et du genre ? La littérature scientifique suit généralement les recommandations des comités de taxonomie qui opèrent sous les auspices de l'Union International de Sociétés Microbiologiques (Sneath, 2001).

La première classification des bactéries lactiques basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques a été établie en 1919 par **Orla-Jensen**. Cette classification a été complétée par la taxonomie moléculaire (**Ludwig et al., 2008**).

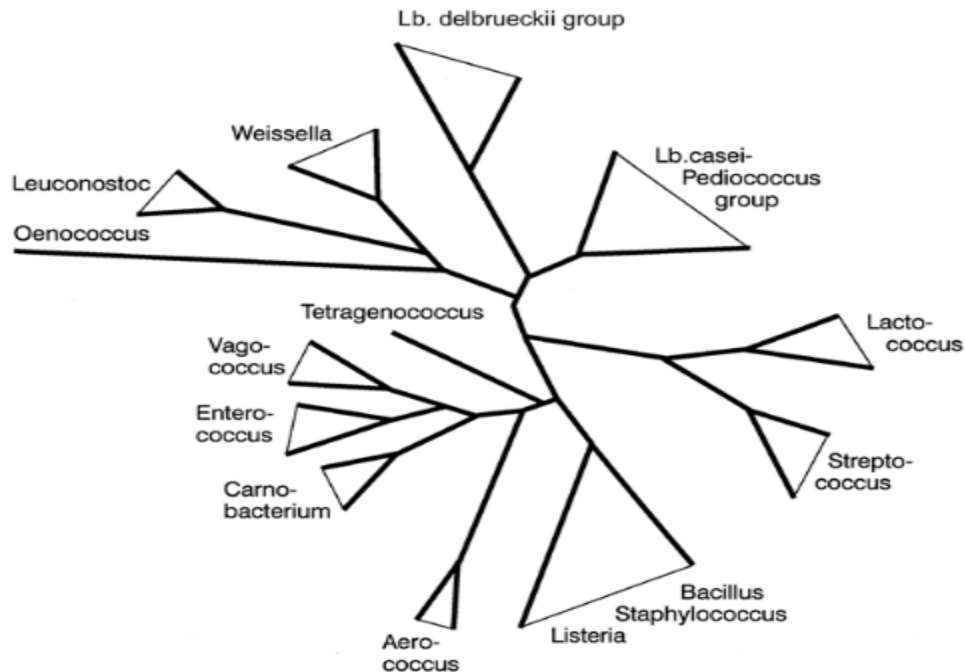


Figure 13. Schéma montrant l'arbre phylogénique des bactéries lactiques y compris des genres apparentés (**Axelsson, 2004**).

D'après **Ludwig et al., (2008)**, le phylum Firmicutes comprend trois classes : Bacilli, Clostridia et Erysipelotrichi. Appartenant à la classe Bacilli, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

- Famille des Lactobacillaceae comportant les Lactobacillus, Paralactobacillus et Pediococcus.
- Famille des Leuconostocaceae contenant les Leuconostoc, Oenococcus et Weissella.
- Famille des Streptococcaceae comprenant les Streptococcus, Lactococcus et Lactovum.

Historiquement, le genre Bifidobacterium était aussi considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal (**Klein et al., 1998**).

4. Les différents genres

Selon la taxonomie courante, le groupe de bactérie lactiques engloberaient 35 genres bactériens (Ludwig *et al.*, 2009) par contre les douze principaux genres incluent *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Stiles et Holzappel, 1997).

4.1. *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*. Les lactobacilles représentent un genre important des bactéries lactiques tant au niveau industriel qu'au niveau de la flore commensale infantile. L'hétérogénéité des espèces est illustrée par le contenu en G + C qui peut varier de 32 à 53 % (Schleifer et Stackebrandt, 1983 ; Pilet M-F. *et al.*, 2005).

La classification remaniée par Kandler et Weiss (1986) les subdivise en 3 groupes selon leur type fermentaire :

➤ **Groupe I** : anciennement appelé *Thermobacterium*. Il regroupe les lactobacilles homofermentaires stricts et thermophiles, ils sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ces bactéries fermentent les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof, en produisant exclusivement de l'acide lactique, elles se développent à 45°C mais pas à 15°C. Leurs cellules sont longues, droites souvent en palissades (Bottazzi, 1988).

➤ **Groupe II** : anciennement appelé *Streptobacterium*. rassemble les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et mésophiles qui se développent à 15°C. Les hexoses sont fermentés par la voie d'Embden-Meyerhof, en produisant exclusivement de l'acide lactique (mais pour certaines souches : du lactate, de l'acétate, de l'éthanol et du formiate), celle des pentoses et du gluconate peuvent être dégradés par la voie hétérofermentaire avec une production d'acide lactique et d'acide acétique par une phosphokétolase inductible. Leurs cellules sont courtes, souvent arrangées en filaments (Bottazzi, 1988).

➤ **Groupe III** : anciennement appelé *Betabacterium*. Ces espèces ont un métabolisme strictement hétérofermentaire. la fermentation des hexoses produit de l'acide lactique, de l'acide acétique (ou de l'éthanol) et du CO₂, celle des pentoses, de l'acide lactique et de l'acide acétique. Ces bactéries possèdent une phosphokétolase (tableau 03). C'est un groupe qui

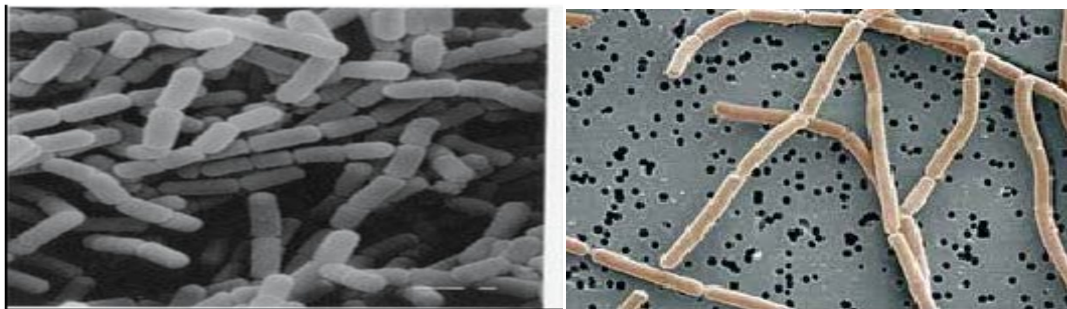
rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles. Les cellules sont courtes, droites et séparées (Bottazzi, 1988).

Tableau 03. Critères différentiels des trois groupes de Lactobacilles (Sharpe, 1981; Kandler et Weiss, 1986).

Caractéristiques	Groupe I Homofermentaires obligatoires	Groupe II Hétérofermentaires facultatifs	Groupe III Hétérofermentaires obligatoires
Fermentation des pentoses	-	+	-
CO ₂ à partir du glucose	-	-	+
CO ₂ à partir du gluconate	-	+	+
FDP aldolase	+	+	-
Phosphokétolase	-	+	+
	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. bachneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i>

FDP : Fructose 1-6 diphosphate aldolase

Les Lactobacilles, de par leur variété, sont présents dans des milieux très différents : cavité buccale, tractus digestif, organes génitaux chez l'homme, produits végétaux (céréales), lait et produits laitiers (différents type de fromages), produits carnés, poissons marinés ou fumés (Novel G., 1993).



A

B

Figure 14. Morphologie de **A:** *Lactobacillus casei* and **B:** *Lactobacillus acidophilus* (Examen en microscopie électronique, ×7000) Photo **Bottazzi Vittorio**

4.2. Carnobacterium

Ce genre a été créé par **Collins et al., (1987)**. Ils sont des bacilles hétérofermentaires souvent trouvés dans les viandes de bœuf, de poisson et de volaille emballées sous vide et stockées à basse température (**Novel G., 1993 ; Joffraud et al., 2006**). Ils ont originellement décrit comme *Lactobacillus mobile*, *Lb. gallinarum*, *Lb. divergens*, *Lb. piscicola* (**Novel G., 1993**). Une étude taxonomique de ces différentes souches a permis de les regrouper après hybridations ADN-ADN, dans un nouveau genre, c'est *Carnobacterium*.

Morphologiquement proche des *Lactobacillus* (petits bâtonnets isolés, par paires ou en courtes chaînes), ils s'en différencient par leur production de l'acide lactique L(+) et leur incapacité à se développer dans les substrats à base d'acétate. En général, les *Carnobacterium* peuvent croître à un pH relativement élevé (par exemple, pH=9) tandis que les lactobacilles ne peuvent pas s'y développer (**Schillinger et Lücke, 1987**). La croissance est possible à 0°C et 10°C mais pas à 45°C, ni en présence de NaCl 18% (**Larpent J-P., 1996a**). Leur contenu G+C est compris entre 33 et 37% (**Dellaglio et al., 1994**). Ce genre comprend 4 espèces fréquemment associées aux aliments : *C. divergens*, *C. piscicola*, *C. mobile* et *C. gallinarum*. Ils sont isolés de produits carnés, ou de produits de la mer, saumon fumé mais certains ont également été isolés de fromages.

4.3. Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus et Vagococcus

Les genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Vagococcus* étaient précédemment inclus dans un seul genre : *Streptococcus* (**Axelsson, 2004**). Ce sont des coques en paire ou en chaîne, leur fermentation est homolactique, produisant en majorité de l'acide L-lactique. Ces espèces diffèrent principalement entre elles par la présence d'un antigène de groupe dit antigène de Lancefield.

➤ Le genre *Streptococcus* comprend la majorité des espèces de streptocoques. Ces organismes ont un contenu en G+C de 35 à 46% (**Pilet M-F. et al., 2005**). Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène, oral et les autres streptocoques.

Le groupe pyogène contient essentiellement des espèces pathogènes, hémolytiques (hémolyse ²) comme *Streptococcus pyogenes* ; d'autres streptocoques oraux (± ou non-hémolytiques) sont associés principalement à la cavité orale de l'homme et de l'animal (*Streptococcus mutans*).

L'espèce thermophile qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus*. Les *Sp. thermophilus* ont été inclus dans le groupe des « autres streptocoques » par **Schleifer et Kilpper-Bälz (1987)**. Du fait par son habitat (lait et végétaux), et son caractère non pathogène seul cette espèce est considérée comme appartenant aux bactéries lactiques.

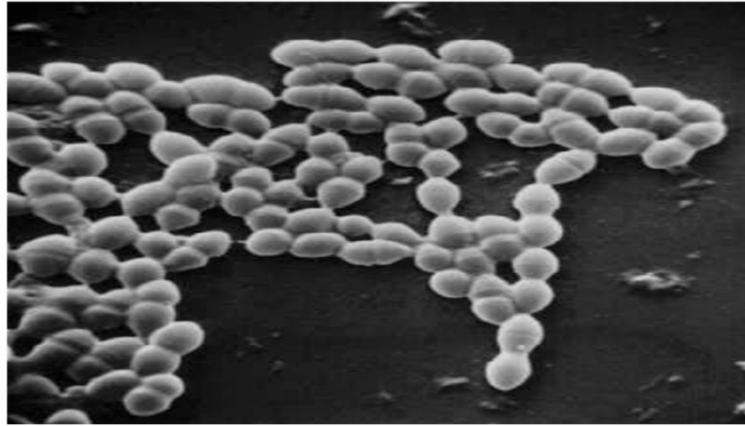


Figure 15. Morphologie en microscopie électronique de *Streptococcus thermophilus* (Liebefeld, 2002).

➤ Le genre *Lactococcus* appartient au groupe N de Lancefield, représente les streptocoques dits « lactiques ». **Schleifer et al., (1985)**, se fondant sur des critères moléculaires, ont proposé de séparer les streptocoques lactiques mésophiles du genre *Streptococcus* et de créer le genre *Lactococcus* (Novel G, 1993).

Les lactocoques sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Trois sous-espèces de *Lc. lactis* peuvent être distinguées : *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. lactis* ssp. *Hordniae* (Novel G, 1993).

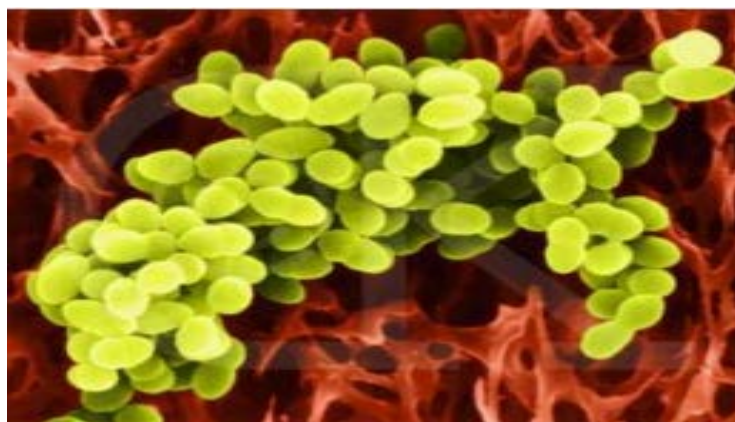


Figure 16. Morphologie en microscopie électronique de *Lactococcus lactis* subsp. “lactis” (Teuber et Geis, 2006).

➤ Le genre *Enterococcus* rassemble la plupart des espèces du groupe D de Lancefield (streptocoques fécaux), présentent une hémolyse de type α , β , et qui se caractérisent par leur développement à 10 et 45°C, leur aptitude à croître en présence de 6,5 % NaCl, et leur grande résistance aux facteurs de l'environnement. Les espèces rencontrées dans l'alimentation sont essentiellement *En. faecalis* (auparavant *Streptococcus faecalis*), et ses variétés (*En. durans* et *En. bovis*).

Leur habitat est très varié : intestin de l'homme et des animaux, produit végétaux, sol, produits laitiers (**Giraffa et al., 1997**).

➤ Les espèces du nouveau genre *Vagococcus* sont facilement confondues avec les lactocoques au niveau morphologique, mais ces deux genres sont clairement distincts par leur composition en acides gras (**Ho, 2008**).

4.4. *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

Ils rassemblent les coques lenticulaires en paires ou en chaînes, mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production de l'acide D(-) lactique.

➤ Le genre *Leuconostoc* a été défini par **Van Thieghem en 1878**. Ce genre a auparavant inclus des coccobacilles hétérofermentaires, produisant uniquement de l'acide lactique, et ne produisant pas d'ammoniac à partir de l'arginine. Leur température optimale de croissance se situe entre 25°C et 30°C, et leurs contenu G+C sont assez voisins (37 à 45%) (**Garvie, 1986**). Leur croissance est toujours lente. Ils ne sont pas hémolytiques ni pathogènes. Ces espèces sont caractérisées par la production à partir du citrate de diacétyle et parfois par la synthèse de dextrans et de lévanes extracellulaires en présence de saccharose (**Novel G., 1993**).

Les études phylogénétiques des *Leuconostoc* montrent une diversité dans ce genre (**Eom et al., 2007**). En général, les *Leuconostocs* sont utiles dans différents types de fromages (**Devoyod et Poullain, 1988 ; Ogier et al., 2008**) où ils facilitent l'«ouverture» par la production de CO₂. Ils interviennent aussi dans l'industrie laitière (beurre et crème) principalement les *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris*, ensilage et les végétaux fermentés (blé, olive, choucroute... etc) (**Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004**).

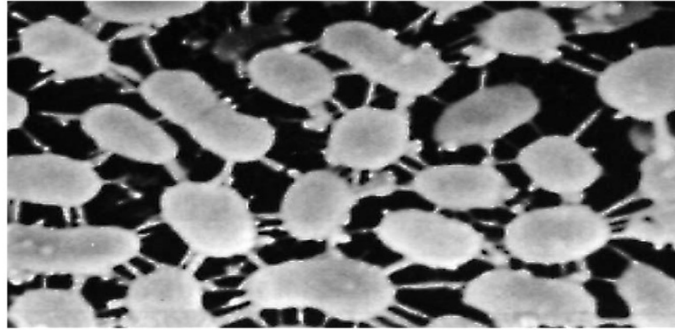


Figure 17. Fixation des Leuconostocs sur les moules en grès-vernisé. #Examen en microscopie électronique de balayage, 11 500×). #Photo **Micheline Rousseau - Christiane Le Gallo** #INRA - C.R. Jouy-en-Josas

➤ L'espèce *Leuconostoc oenos* isolée de vins a été renommée *Oenococcus oeni* et certains lactobacilles hétérofermentaires ont été groupés avec *Leuconostoc* #paramesenteroides dans le nouveau genre *Weissella* (**Stiles et Holzappel, 1997**).

4.5. *Aerococcus*, *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Ce sont des coques formées de cellules groupées en paires ou en tétrades. Ils sont mésophiles, #homofermentaires, et le plus souvent incapable d'utiliser le lactose.

➤ Sept espèces de *Pediococcus* sont connues : *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicum*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* et *P. urinaequi*. Ils fermentent #les sucres en produisant de l'acide lactique DL ou L(+) et sont aussi caractérisés par le #GC% de leur ADN (34-42%). Ces dernières sont importantes dans l'agroalimentaire #tant sous l'aspect négatif que positif. Ce sont des agents de dégradation en brasserie #(*P. damnosus*). Les *P. acidilactici* et *P. pentosaceus* ont démontré leur utilité dans #l'élaboration de plusieurs végétaux fermentés. Ils sont parfois utilisés #comme levains lactiques pour les charcuteries (**Gonzalez #et al., 2007 ; Gurira et Buys, 2005**).

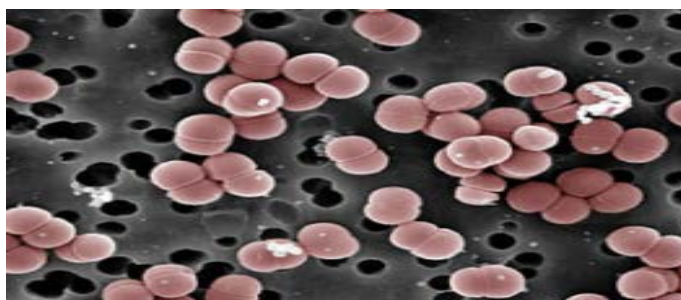


Figure 18. Morphologie en microscopie électronique de *Pediococcus* sp #Photo **Sylviane Lemarinier** (Université de Caen)

➤ L'espèce *Pediococcus halophilus* a été renommée *Tetragenococcus halophilus*. Seulement deux espèces de *Tetragenococcus* sont connues : *T. halophilus* et *T. muriaticus*. Ces bactéries résistent à des concentrations élevées en sel (supérieures à 8 % NaCl). Ils ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires comme les saumures (anchois salés), les sauces de soja, etc. (Gurira et Buys, 2005).

➤ Le genre *Aerococcus* qui contient cinq espèces est généralement moins intéressant dans l'agroalimentaire (Axelsson, 2004).

4.6. Bifidobacterium

Les *Bifidobacterium* (l'ancien nom étant *Lactobacillus bifidus*), la forme des cellules de *Bifidobacterium* est très irrégulière, pouvant être : cellules courtes, conoïdales, cellules ramifiées, spatulées, isolées ou en chaîne, disposées en V ou en palissade (Larpen J-P., 1996a ; Pilet M-F. *et al.*, 2005).

Elles se différencient des autres bactéries lactiques par leur caractère anaérobie, leur contenu G+C (55-67%) et la présence d'une enzyme, (la fructose-6-phosphocétolase). En fait *Bifidobacterium* permet de fermenter les hexoses en produisant plus d'acide acétique que l'acide lactique (rapport 3:2), de faibles quantités d'éthanol et d'autres acides organiques. Cette fermentation « lactique » a conduit à les rapprocher du groupe des bactéries lactiques (Pilet M-F. *et al.*, 2005). Leur température de croissance est comprise entre 37°C et 41°C.

Ils sont isolés à partir de la flore intestinale du nouveau-né, on les retrouve aussi dans l'intestin de l'homme et de nombreuses espèces animales. Ils sont utilisés dans la fabrication du yaourt et produits laitiers fermentés (probiotiques). Leur présence entraînerait une protection contre les agents infectieux au niveau intestinal grâce à la présence d'un facteur bifidogène (Sondergaard, 2005).

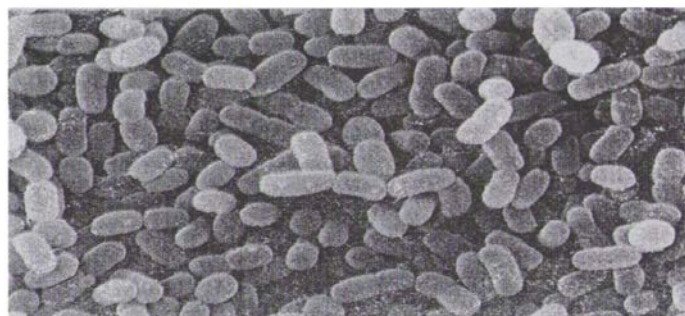


Figure 19. Morphologie en microscopie électronique de *Bifidobacterium animalis* Photo Sylviane Lemarinier (Université de Caen).

5. Méthodes d'identification des bactéries lactiques

5.1. Méthodes classiques

Les caractéristiques phénotypiques ont généralement servi de point de départ pour plusieurs tests sophistiqués et constituent la base de différenciation et d'identification des bactéries lactiques. Différents tests clefs sont largement adoptés. La morphologie ainsi que les méthodes physiologiques, métaboliques/biochimiques et chimiotaxonomiques sont les plus utilisées (Axelsson, 2004).

Les méthodes physiologiques incluent principalement, la croissance à certaines températures, à certaines concentrations de NaCl, à différents pH. Les méthodes métaboliques-biochimiques incluent principalement, la production de CO₂ en milieu glucosé, le profil de fermentation de nombreux sucres, l'hydrolyse de l'arginine, de l'esculine et la détermination de l'isomère optique de l'acide lactique. Les méthodes chimiotaxonomiques incluent principalement la détection de l'acide meso-diaminopimelique (mDAP) dans le peptidoglycane. Le Tableau 04 présente les différentes caractéristiques de bactéries lactiques. Schillinger et Lücke (1987) ont été les premiers à proposer une clef d'identification des bactéries lactiques de la viande basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques et biochimiques typiques des différentes espèces (Ammor, 2004).

Plus les méthodes mentionnés en dessus, il ya aussi la technique sérologique. pour les bactéries lactiques, l'analyse sérologique de fait principalement suivant la méthode de Lancefield (1933), basée sur l'utilisation de polysaccharides de l'enveloppe cellulaire en tant qu'antigènes (Curk et al., 1994).

Tableau 04. Les différentes caractéristiques de bactéries lactiques (Axelsson, 2004).

Genres	Morphologie cellulaire	Type fermentaire	Croissance à température		Croissance en présence de NaCl		Croissance à pH		Isomère d'acide lactique
			10C°	45C°	6,5%	18%	4,4	9,6	
Lactobacillus	Bâtonnet	Homo/Hétéro	±	±	±	-	±	-	D,L,LD
Lactococcus	Cocci	Homo	+	-	-	-	±	-	L
Leuconostoc	Cocci	Hétéro	+	-	±	-	±	-	D
Oenococcus	Cocci	Hétéro	+	+	±	-	±	-	D
Pediococcus	Cocci; tétrade	Homo	±	±	±	-	+	-	D,L,LD
Streptococcus	Cocci	Homo	-	+	-	-	-	-	L
Tetragenococcs	Cocci; tétrade	Homo	+	-	+	+	-	+	L
Aerococcus	Cocci; tétrade	Homo	+	-	+	-	-	+	L
Carnobacterium	Bâtonnet	Hétéro	+	-	-	-	-	-	L
Enterococcus	Cocci	Homo	+	+	+	-	+	+	L
Vagococcs	Cocci	Homo	+	-	-	-	±	-	L
Weissella	Cocci	Hétéro	+	-	±	-	±	-	D,L,LD

+ : positif ; - : négatif ; ± : réponse variable selon les espèces

5.2. Méthodes moléculaires

Les méthodes modernes d'identification des bactéries lactique font appel à l'étude des# constituants des cellules.#Le séquençage de l'ARN 16S reste une des méthodes les plus appliquées pour obtenir une#identification précise en complément des méthodes classiques. Cependant plusieurs méthodes#d'identification par PCR, plus abordables en routine se sont développées pour l'identification#des bactéries lactiques.#Pour la différenciation intraspécifique, les différentes méthodes moléculaires, comme#composition en base de l'ADN : G+C%, l'hybridation ADN/ADN et ADN/ARN, l'analyse#des fragments de restriction de l'ADN par l'électrophorèse en champ pulsé (R-ECP), les#profils protéiques par SDS-PAGE, sont généralement couplées et permettent l'analyse de la#biodiversité des isolats dans un écosystème donné (Ludwig *et al.*, 2009).

6. Bactéries lactiques et santé humaine

Dans le domaine de la santé, certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire des micro-organismes vivants dont l'application à l'homme ou à l'animal exercent un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinale. Les espèces couramment utilisées sont *Lb. Acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri*, *Lb. delbruecki*, subsp *bulgaricus* (**Salminen et al., 2004**).

Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement de certaines affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires. D'autres effets, comme la prévention des gastro-entérites nosocomiales. Chez le nourrisson, des propriétés anticancérogènes, antihypercholestérolémiques, lutte contre *Clostridium difficile* et *Helicobacter pylori*, prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (**Drouault et Corthier, 2001**).

7. Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

On reconnaît depuis longtemps, aux bactéries lactiques, la propriété de produire des substances antibactériennes leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. L'activité antagoniste des bactéries lactiques est due aux métabolites excrétés : l'acide lactique et autres acides organiques, peroxyde d'hydrogène, diacétyl, reutéline et les bactériocines (**Leveau et al., 1991 ; Klaenhammer et al., 1994 ; De Vuyst et Leroy, 2007**).

7.1. Les acides organiques

Le métabolisme principal des bactéries lactiques a pour effet une production importante des acides organiques. Les acides organiques sont produits soit par les bactéries homofermentaires, soit par les bactéries hétérofermentaires. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation uniquement d'acide lactique chez les homofermentaires tandis qu'il conduit à la formation d'acide lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone chez les hétérofermentaires (**Liu, 2003**).

En général, la production d'acides organiques permet une acidification du milieu qui peut limiter la croissance de certaines bactéries entre autres les bactéries indésirables et pathogènes. Ainsi, les acides organiques ont différentes actions telles qu'un excellent pouvoir bactéricide ou un effet bactériostatique contre les micro-organismes pathogènes se trouvant dans le tube digestif. Les acides organiques sont un des agents classiques de préservation des aliments et sont reconnus comme des additifs alimentaires (**Brul et Coote, 1999**).

7.2. Le peroxyde d'hydrogène

L'intervention du peroxyde d'hydrogène dans les phénomènes d'inhibition par les bactéries lactiques a été établie. En 1951 **Wheater et al.**, mettent en évidence l'inhibition de *Staphylococcus aureus* par *Lactobacillus lactis* et l'attribuent à une « lactobacilline ». Dès 1952 ils montrent que l'agent inhibiteur est en fait le peroxyde d'hydrogène produit par le lactobacille (**Mathot et al., 1996**).

Les bactéries lactiques sont catalase négatives et certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) essentiellement par le métabolisme aérobie ou en microaérobiose des glucides. Le peroxyde d'hydrogène est, depuis longtemps, reconnu comme un agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques en particulier celle des lactobacilles. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires (**Zalan et al., 2005**).

7.3. Le dioxyde de carbone

Celui-ci est formé pendant la fermentation hétérolactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité. Ainsi le CO₂ peut effectivement inhiber la croissance de nombreux germes d'altération et essentiellement les germes psychrotrophes à Gram négatif (**Ammor et al., 2006**).

7.4. Le diacétyl

Le diacétyl (C₄H₆O₂) produit par des bactéries lactiques est un inhibiteur actif contre de nombreux microorganismes, bactéries ou moisissures. L'action inhibitrice est accrue en milieu acide, les bactéries Gram-négatives sont plus sensibles que les bactéries Gram-positives (**Mathot et al., 1996**).

Il est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp., et *Pediococcus* sp (**El Ziney et al., 1998**), et les concentrations nécessaires à l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm (**Caplice et Fitzgerald, 1999**).

7.5. La reutérine

Axelsson et al., (1989) ont mis en évidence l'action inhibitrice d'une substance produite par *Lactobacillus reuteri*. Cette substance (reutérine) a été purifiée et identifiée.

La reutéline (ou 3-hydroxypropionaldéhyde) est une substance antimicrobienne qui est produite comme métabolite intermédiaire pendant la fermentation anaérobie du glycérol. La reutéline a un large spectre d'activité. Elle a une action contre les procaryotes (Gram-positif ou Gram-négatif), les eucaryotes, les virus, les champignons et les protozoaires. Elle interfère avec la réplication de l'ADN. Elle a des applications aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine alimentaire (Vollenweider, 2004).

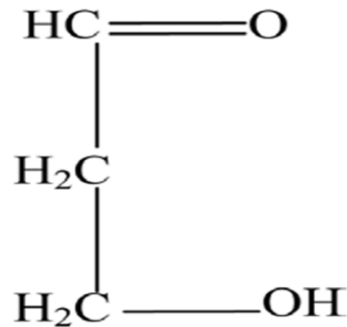


Figure 20. Structure de la reutéline, 3-hydroxypropanal (Axelsson, 2004).

7.6. Les bactériocines

La détection de la première bactériocine remonte à 1925 par André Gratia qui a observé que la croissance de certaines souches d'*Escherichia coli* a été inhibée en présence d'un composé antibactérien, dont il a donné le nom de colicin V. La découverte d'une bactériocine chez les lactocoques remonte à 1933. À cette époque, Whitehead (1933) avait observé dans un lait spécifique que la présence de deux souches de lactocoques inhibait la croissance d'un ferment de culture fromagère. En 1953, Jacob *et al.*, proposèrent le terme général « bactériocine ». Les bactériocines diffèrent de la plupart des antibiotiques thérapeutiques par leur composition protéique et possèdent généralement une spécificité d'action étroite contre les mêmes espèces (Tagg *et al.*, 1976).

7.6.1. Classification des bactériocines

On trouve des souches productrices de bactériocines chez tous les genres de bactéries lactiques. Le nombre de bactériocines des bactéries lactiques caractérisées a augmenté de façon exponentielle depuis une dizaine d'années en raison de l'intérêt tant fondamental qu'appliqué qu'elles suscitent.

D'après (Klaenhammer, 1993), leur structure primaire a permis de définir une classification en quatre classes :

➤ Classe I - Les lantibiotiques

Il s'agit de peptides de taille réduite (< à 5 kD), contenant des acides aminés inhabituels obtenus par modification post-traductionnelle dont le plus caractéristique est la lanthionine (Morisser *et al.*, 2005). Les lantibiotiques sont stables à la chaleur. Ils peuvent être divisés en deux types : la classe Ia qui contient des peptides cationiques hydrophobes allongés contenant jusqu'à 34 acides aminés et la classe Ib qui contient les peptides globulaires chargés négativement ou sans charge nette et contenant jusqu'à 19 acides aminés. La nisine, la subtiline, la duramycine ainsi que la tytolysine L1 sont des exemples de lantibiotiques (Mc Auliffe *et Hill*, 2001; Twomey *et al.*, 2002).

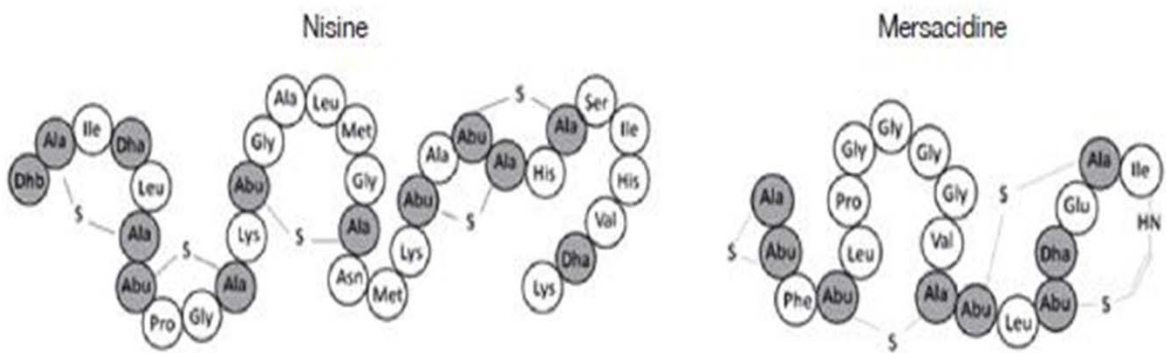


Figure 21. Séquence et structure de lantibiotiques de type **A** (nisin) et **B** (mersacidin) (Dortu et Thonart, 2009).

➤ Classe II

La classe II est caractérisée par des petits peptides (< 10 kDa). Ces peptides demeurent également stables après un traitement à la chaleur et sans modification post-traductionnelle. Ces peptides sont le plus souvent produits sous forme de prépeptide dont le leader N-terminal sera clivé au niveau d'un doublet glycine. Cette classe est divisée en trois sous classes. Sous classe IIa Bactériocine active contre les espèces de *Listeria monocytogenes* (Cenatiempo *et al.*, 1996 ; Axelsson, 2004). Ils 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).

Ces bactériocines semblent par ailleurs avoir une meilleure activité antimicrobienne, un spectre d'action plus large et une meilleure résistance à l'exposition à des hautes températures (Fimland *et al.*, 2000 ; Drider *et al.*, 2006 ; Richard *et al.*, 2006).

Sous classe IIb correspond à des bactériocines à deux composants. Ont pour trait commun la nécessité de la mise en commun de plusieurs petits peptides aboutissant à un ensemble biologiquement actif. Entrent dans cette catégorie diverses lactococcines, plantaricines ou encore la lactacine F (Allison *et al.*, 1994).

Sous classe IIc Peptides thiol-actives requérant la réduction du résidu cystéine pour être actif. Les bactériocines de classe II n'appartenant pas aux sous-classes IIa et IIb seront considérées comme étant de sous-classe IIc (Allison *et al.*, 1994).

➤ Classe III

Les bactériocines de classe III sont caractérisées par leur grande taille. Il s'agit de protéines dont la masse est supérieure à 30 kDa et thermosensible. Ils sont en effet détruits par un chauffage de 10 à 15 min à 60°C. La plupart d'entre elles sont produites principalement par des souches de lactobacilles. Helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Nilsen *et al.*, 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigmatova *et al.*, 2007).

Tableau 05. Liste des bactériocines appartenant à la classe III (Klaenhammer, 1993; Riley et Wertz, 2002)

Bactériocin	Producing strains	Antimicrobial activity
Acidophilucin A	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> and <i>Lb. helveticus</i>
Caseicin	<i>Lb. casei</i> B40	<i>Lb. casei</i>
Helveticin J	<i>Lb. helveticus</i> 481	<i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> and <i>lactis</i>
Helveticin V-1829	<i>Lb. helveticus</i> 1829	<i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>
Lactacin A	V. <i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>
Lactacin B	VI. <i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> and <i>delbrueckii</i>

➤ Classe IV

Englobe les bactériocines qui nécessitent une partie non protéique pour être active. Cette quatrième classe, comportant des bactériocines complexes qui exigent des carbohydrates ou les fractions lipidiques pour leur activité biologique (Morisset *et al.*, 2005 ; Savadogo *et al.*, 2006). Les bactériocines de classe IV présentée par Klaenhammer (1993) a été contestée par la suite par de nombreux auteurs, puisque aucun de ces peptides n'a été copurifié avec sa partie glucidique ou lipidique (Nes *et al.*, 1996).

7.6.2. Les mécanismes d'action des bactériocines

Toutes les bactériocines de bactéries lactiques, dont le mode d'action a été étudié, paraissent agir de façon similaire en formant des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles. La formation des pores dans la membrane cytoplasmique va causer l'efflux rapide de petits composés cytoplasmiques tels que les ions, les acides aminés, l'ATP... (Montville *et al.*, 1995 ; Dortu et Thonart, 2009) qui aura pour conséquence de perturber le potentiel transmembranaire et le gradient de pH, à la cessation rapide des activités cellulaires et à la mort de la cellule. Certaines bactériocines, comme la nisine (lantibiotiques), n'ont pas de récepteur spécifique. En effet, la nisine semble se lier aux lipides et phospholipides cationiques présents à la surface de la cellule (Rink *et al.*, 2005; Moll *et al.*, 1999). Par contre, il semblerait que pour les lactococcines A, B et M. l'initiation de la formation de pores nécessite la présence d'un récepteur spécifique qui permet la fixation de la bactériocine à la membrane cellulaire (van Belkum *et al.*, 1991). De plus, certaines bactériocines, telles que, la bactériocine J46 dont l'activité dépend de la présence d'une force proton motrice sur la membrane pour pouvoir s'y lier. Certaines bactériocines ne sont pas actives à pH 7 et donc une activité due à la production d'une bactériocine pourrait être considérée comme étant due à la production d'acide (Klaenhammer, 1993).

Gravesen *et al.*, (2002) ont examiné la résistance de *Listeria monocytogenes* à la classe II des bactériocines et ont trouvés un rapport avec le site spécifique de reconnaissance. Huit mutants de *L. monocytogenes* résistants aux bactériocines de la classe IIa, tel que la pediocine PA-1 et la leucocine A, ont été isolés et étudiés. La lacticine 3147 est un lantibiotique constitué de 2 composants, 2 peptides appelés lac 1 et lac 2 (McAuliffe *et al.*, 1998); les deux composants sont nécessaire pour exercer une activité antagoniste complète résultant de la formation de pores ioniques spécifiques dans la membrane de la cellules gram positive cible. McAuliffe *et al.*,

(2000) ont démontrés que la lacticine 3147 exige une enzyme de modification séparée pour chacun des prepeptides lac1 et lac2.

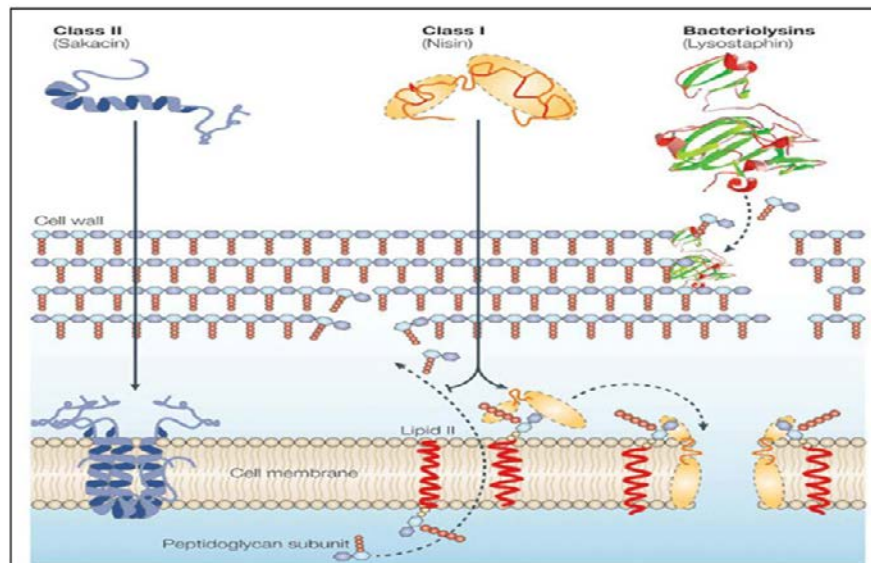


Figure 22. Mode d'action des bactériocines de bactéries lactiques (Paul *et al.*, 2005).

7.6.3. Les applications des bactériocines dans l'industrie alimentaire

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. Leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou détériorantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide (Galvez *et al.*, 2007). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques, peuvent être considéré comme des conservateurs naturels ou biopreservateurs qui accomplissent ces exigences.

Les bactéries productrices peuvent également être appliquées dans les produits alimentaires, peuvent être ajoutées comme starter dans des produits fermentés ou comme culture protectrice. Elles doivent être capables de croître et de produire des bactériocines dans l'aliment à conserver. La combinaison de différentes bactériocines permet d'augmenter l'activité et le spectre d'action, tout particulièrement en combinant des bactériocines appartenant à des classes différentes. La combinaison des bactériocines avec d'autres traitements de conservation chimique ou physique donne des résultats prometteurs pour la conservation des aliments (Vignolo *et al.*, 2000).

1. Objectifs :

Notre travail aborde plusieurs aspects liés à une étude *in vitro* qui consiste à l'extraction de jus de l'orge, l'isolement des bactéries lactiques et l'identification de ces dernières.

1.1 Justification scientifique :

Le choix de l'orge comme matériel végétal est essentiellement du au fait que ce type de l'orge est moins consommé dans notre pays et qu'il a été très peu étudié, comparativement aux autres céréales. Le deuxième critère se rattache aux vertus médicinales de l'orge qui possède une grande valeur nutritive pour les personnes atteints du cancer du colon.

2. Matériel végétal :

2.1 Provenance de l'échantillon :

On a utilisé l'orge récolté des régions de la commune de El Hadjadj#Wilaya de Mostaganem

L'échantillon à été stocké à l'obscurité au réfrigérateur dans un emballage alimentaire à 04°C jusqu'à l'utilisation.

2.2 Milieux de culture :

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés pour l'isolement, la purification, la réactivation des différentes souches au cours de cette étude expérimentale, il s'agit des milieux suivants :

➤ **Les milieux solides** : MRS, M17, MSE, GN.

➤ **Les milieux liquides**: BN, MRS à différents pH (4.5, 6.8 et 9.5), bouillon MRS sans sucre, bouillon hypersalé à 1%, 2%, 3%, 6.5% de NaCl (Naylor et Sharp), bouillon Møeller à arginine, bouillon Clark et Lubs, lait de Sherman à 1% et 3% de bleu de méthylène.

L'incubation, en raison de l'anaérobiose, se fait dans une jarre d'anaérobioses (Fitzsimmons *et al.*, 1999).

La composition des milieux de culture utilisés sont rassemblés dans l'annexe.

3 Isolement des souches lactiques :

3.1 Suspension mère et dilutions décimales :

Après la macération dans l'eau physiologique pendant 24 heures de 40g de l'échantillon de l'orge, on a introduit aseptiquement le jus pour la réalisation d'une série de dilution

décimale (de 10^{-1} jusqu'à 10^{-6}) dans des tubes stériles contenant au préalable de 9 ml de MRS liquide.

3.2 Isolement :

L'isolement sélectif des bactéries lactiques par culture sur plusieurs milieux a été réalisé selon les méthodes décrites par **Carr *et al.*, (2002)**, 1 ml de chaque dilution est ensemencé dans la masse des milieux solides (MRS et M17) pour l'obtention des colonies bien séparées. Après incubation à $37^{\circ}\text{C}/24$ à 72 heures, un examen microscopique est effectué après coloration de Gram. La forme des cellules et leur mode d'association sont observés et notés.

Les isolats à Gram (+) et catalase (-) sont repiqués de façon alternée sur milieu MRS liquide et solide (ou M17 liquide ou solide) jusqu'à la purification. A chaque fois, 7 à 10 colonies représentatives bien isolées sont prélevées du milieu MRS solide (ou M17 solide) et transférées sur MRS liquide (ou M17 liquide) et vice versa. La pureté de la souche est vérifiée par une observation microscopique [l'aspect des colonies (forme, couleur, taille)].

3.3 Conservation des souches :

La conservation des souches pures est faite selon deux formules: à court et à long terme.

➤ La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu solide incliné. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à $+4^{\circ}\text{C}$ et leur renouvellement se fait par repiquage toutes les 4 semaines (**Devoyod et Muller, 1969**).

➤ La conservation à long terme des souches retenues est réalisée à -20°C dans une solution contenant 70% de lait écrémé (enrichie par 0.5g/l d'extrait de levure et 0.5g/l de glucose) et 30% de glycérol à 40% (**Samelis *et al.*, 1994; Bolduc *et al.*, 2006**).

3.4 Dénombrement des bactéries lactiques:

Pour dénombrer la flore lactique présentée dans notre échantillon, on a utilisé le milieu MRS 0,5ml de chaque dilution de solution mère SM1 est ensemencée en masse ensuite les boîtes sont incubées à 37°C . Le dénombrement se fait après 72h.

Après le comptage des colonies, on applique la formule mathématique suivante :

$$N = \frac{\bullet \text{ Colonies}}{V_{\text{ml}} \times (n_1 + 0,1n_2) \times d_1}$$

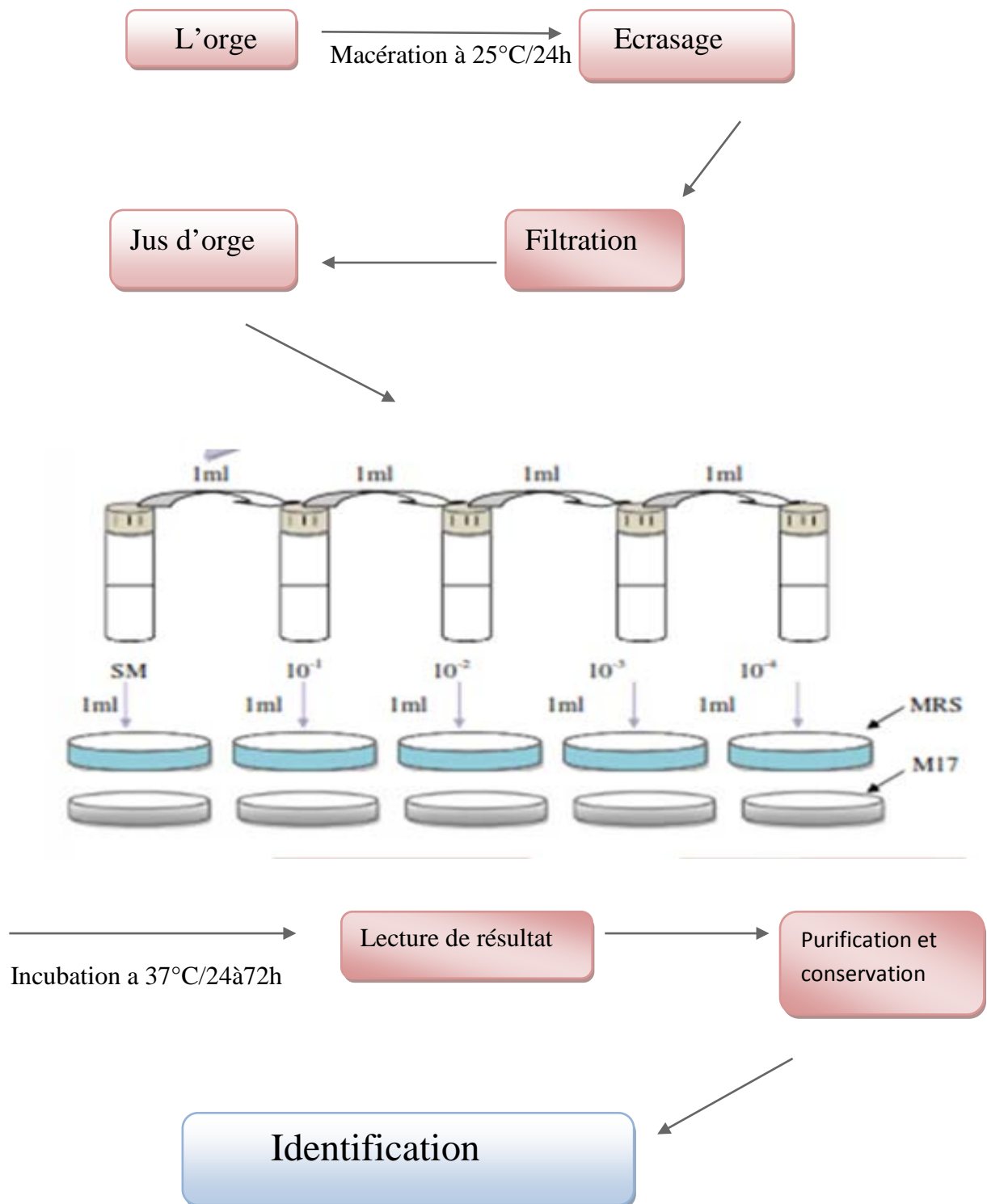


Figure 03. Protocole d'isolement des souches lactiques de l'orge

3.5 Identification physiologique et biochimique des isolats :

L'identification a été établie en se basant sur des caractères morphologiques et divers caractères biochimiques : production d'enzymes, température de croissance, production de gaz carbonique, fermentation de divers sucre.

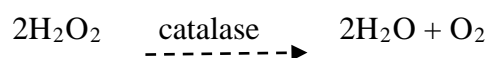
3.5.1 Pré-identification des isolats :

3.5.1.1 Observation macroscopique :

Une description des colonies observées sur les différents milieux a été effectuée. Cela concerne leur taille, leur couleur, leur forme, leur contour, leur viscosité, leur aspect... (**Badis et al., 2004**).

3.5.1.2 Test de catalase :

Pendant leur respiration aérobie certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capables de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



Ce test a pour but de différencier les bactéries lactiques [catalase(-)] des entérobactéries [catalase(+)]. Une colonie est mise en suspension avec une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène (10 volumes) sur une lame. La réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (O_2) (**Marchal et al., 1991**).

3.5.1.3 Observation microscopique :

a. Coloration de gram :

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au *violet de gentiane*; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de *Lugol*, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et en fait couler le solvant sur le frottis pendant 2 à 3 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. A ce stade les cellules gram(-) seront incolores, les cellules gram(+) violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la *fushine* pour colorer les cellules gram(-)

présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif à immersion (grossissement % 1000) (**Singleton, 1999**).

Cette coloration permet de différencier les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association dont les souches testés étaient Gram (+) sont présentées sous forme bacilles ou coques. Ces résultats nous orientent vers les démarches à suivre pour les autres testes (**Larpen et al., 1990; Ventura & Zink, 2002**).

b. Etat frais :

Un tube contenant le milieu MRS liquide (10ml) est inoculé par une colonie isolée sur gélose MRS, on incube à $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures, jusqu'à l'apparition d'un trouble microbien. Pour la mobilité et la forme, une lame additionnée d'une goutte de la culture est observée au microscope.

3.5.2 Identification partielle (Tests biochimiques) :

3.5.2.1 Test de Croissance à différentes températures :

Les souches jeunes bactériennes ont étéensemencées dans des bouillons MRS (pH 6,8) et testées leurs croissances à différentes températures (04, 30, 37 et 45 C°). Le développement des souches était appréciée après une semaine d'incubation pour les cultures à 04 C° et après 24 à 72 heures pour les autres cultures, par comparaison avec un tube de milieu MRS liquide nonensemencé. L'apparition de trouble indique la croissance des souches (examen de la turbidité) (**Larpen, 1996**).

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (**Leveau et al., 1991**).

3.5.2.2 Test de Croissance à différentes PH :

Une série d'essais a été réalisée sur le milieu MRS liquide avec un pH de 4,5, 6,5 et 9,3 avec incubation à 37°C pendant 24 heures. Après le temps d'incubation, l'observation d'un trouble signifié la croissance bactérienne (**Badis et al., 2005**).

3.5.2.3 Test de Croissance à différentes concentrations de NaCl :

Généralement, les bactéries lactiques ne poussent pas dans des bouillons hypersalés, pour cela Quatre milieux de MRS liquides ont été utilisés contenant différentes concentration de NaCl : 1% de NaCl (1 g de NaCl par 100 ml de milieu), 2%, 3% et 6,5%, avec un pH de 6,5 pendant

24 à 72 heures (**Carr et al., 2002**). Le développement des cultures a été apprécié par comparaison avec un tube témoin non ensemencé, incubé dans les mêmes conditions (**Badis et al., 2005**).

3.5.2.4 Test de la thermorésistance :

Des tubes contenant 10 ml de bouillon MRS sont inoculés par les souches isolées, ensuite les tubes sont déposés dans un bain marie à 63,5°C pendant 30 minutes. Après refroidissement, elles sont incubées à 30°C±1°C pendant 48 à 72h. Un résultat positif se traduit par un trouble (**Badis et al., 2005**).

3.5.2.5 Test de production d'acétone (VP/RM) :

La recherche de l'acétone est testée par la réaction de Voges Proskauer (VP) (**Harrigan et McCance, 1976; Zourari et al., 1991; Facklam et Elliot, 1995**).

Des tubes contenant chacun 5 ml de milieu **Clark et Lubs** sont ensemencés à l'aide d'une anse, après incubation à 30°C±1°C pendant 18 à 48 h, on ajoute trois gouttes de réactif VP1 (solution de soude NaOH à 16% dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VP2 (alpha-naphtol à 6% dans l'alcool à 95°). On Agite soigneusement les tubes et on attend un temps maximum de 10 min.

- Une teinte rouge cerise (anneau) indique une réaction VP positive.

Si la réaction est négative, on ajoute trois gouttes de réactif RM.

- Une teinte rouge indique une réaction RM positive (**Marchal et al., 1991**).

3.5.2.6 Hydrolyse de l'arginine (ADH) :

Elle est mise en évidence sur un milieu de Moëller (**Moëller, 1955; Harrigan et McCance, 1976**), Pour chaque souche isolée et ensemencée; un tube de bouillon Moëller arginine et un tube témoin (Moëller sans arginine) sont recouverts (avec 4 à 5 ml d'huile de paraffine (V/V) stérilisé) et incubés pendant 24 à 72 heures à 30°C.

La culture dans le tube témoin se manifeste par un virage au jaune dû à l'acidification du milieu (métabolisme du glucose).

La dégradation de l'arginine aboutissant à la formation d'ammoniaque est révélée par alcalinisation du milieu qui devient violet (**Larpen-Gourgaud et al., 1997; Carr et al., 2002**).

3.5.2.7 Production de d'extrane :

Chez les souches du genre *Leuconostoc*, ce test est considéré comme clé d'identification. La synthèse de dextrane à partir du saccharose est mise en évidence dans le milieu MSE gélosé par l'ensemencement des souches jeunes et une incubation réalisée à 30°C pendant 24h à 72 heures en aérobiose. La synthèse de dextrane se traduit par la formation des colonies larges, visqueuses et gluantes sur les boîtes de pétrie (Mayeux *et al.*, 1962).

3.5.2.8 Type fermentaire :

Dans des tubes à essai on a versé un milieu bouillon MRS et entreposé des cloches de Durham pour mettre en évidence la production de gaz. Ensuite on a ensemencé les souches.

Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO₂, par contre les souches hétérofermentaires vont produire l'acide lactique et le CO₂ à proportions égales (Carr *et al.*, 2002).

3.5.2.9 Croissance sur le lait bleu de Sherman :

On teste le développement en présence 1% et 3% de bleu de méthylène. Le lait écrémé additionné de 0,1% et 0,3% de bleu de méthylène (1ml de solution à 1% et 3% par tube de 9ml de lait) est ensemencé et incubé à 30°C durant une période de 24 à 48h (Leveau *et al.*, 1991). Ce test permet la différenciation entre certains genres lactiques (Guirraud, 1998).

3.5.2.10 Test d'amylase :

L'amidon est une macromolécule glucidique. Il s'agit d'un polymère de glucose (enchaînement de glucose). Ce milieu permet après culture de mettre en évidence la capacité de la bactérie à dégrader ce substrat l'amidon. Ceci revient à déterminer si elle possède une enzyme spécifique (l'amylase).

On ensemence les souches lactiques dans le MRS solide contenant l'amidon (à base de 1,5 g/l), et on fait l'incubation à 37°C pendant 72 heures.

Après culture, l'ajout de lugol (contenant du di-iode) sur les colonies permettra de mettre en évidence la présence ou non d'halos d'éclaircissement autour des colonies et donc sa dégradation. Dans ce cas on dira que la bactérie possède l'amylase (Guirraud, 1998).

3.5.2.11 Test de Gélatinase :

C'est une recherche qui est intéressante pour identifier de très nombreux germes, appartenant à des familles et à des genres bactériens très différents.

On ensemence les souches lactiques dans un milieu contenant MRS solide + la gélatine (à base de 20 g/l), et on incube à 37°C pendant 72 heures à 7 jours. La présence de la gélatinase se fait par l'absence de la gélatine autour de la bactérie lactique (la dégradation de la masse de gélatine) (**Guirraud, 1998**).

3.5.2.12 Test de caseinase :

La caséine est la protéine du lait, c'est un critère d'identification appartenant à l'étude du métabolisme protidique qui nous permettra de différencier les bactéries entre elles.

On ensemence les souches lactiques dans un milieu contenant MRS solide + le lait écrémé (à base de 120 g/l), et on incube à 37°C pendant 72 heures.

La gélose au lait a un aspect opaque blanc. Si la bactérie possède la caseinase donc elle va dégrader la caséine ce qui aura pour effet d'éliminer l'aspect blanc de la gélose autour des colonies (**Guirraud, 1998**).

3.5.2.13 Tests de fermentation des sucres :

Il s'agit d'apprécier l'aptitude des souches à métaboliser divers substrats carbonés en particulier les sucres. Ce test est réalisé en galeries classiques par des tubes de bouillon MRS sans extrait de viande et sans citrate (MRSc-ev), [selon **Leveau et al., (1991)**], additionné d'un indicateur de pH (pourpre de bromocrésol à 0.04 g/l), le glucose du milieu MRS est remplacé par le sucre à tester, les solutions de sucres (maltose, galactose, inositol, rhamnose, glucose, adonitol, cellubiose, mannose, mellibiose) sont stérilisées par tyndallisation et après ils ont introduit dans le milieu avec une concentration finale de 1%.

Un 0,1 ml de suspension bactérienne est ensemencé dans 2ml du MRSc-ev-BCP-sucre avec l'ajout d'une couche mince d'huile de paraffine (V/V) stérilisé pour assurer l'anaérobiose (**Samelis et al., 1994**).

Après incubation pendant 48h à 72h, le développement de la culture et le virage au jaune de l'indicateur coloré dû à l'acidification du milieu traduit la fermentation du sucre à tester (**Guessas et Kihal, 2004**).

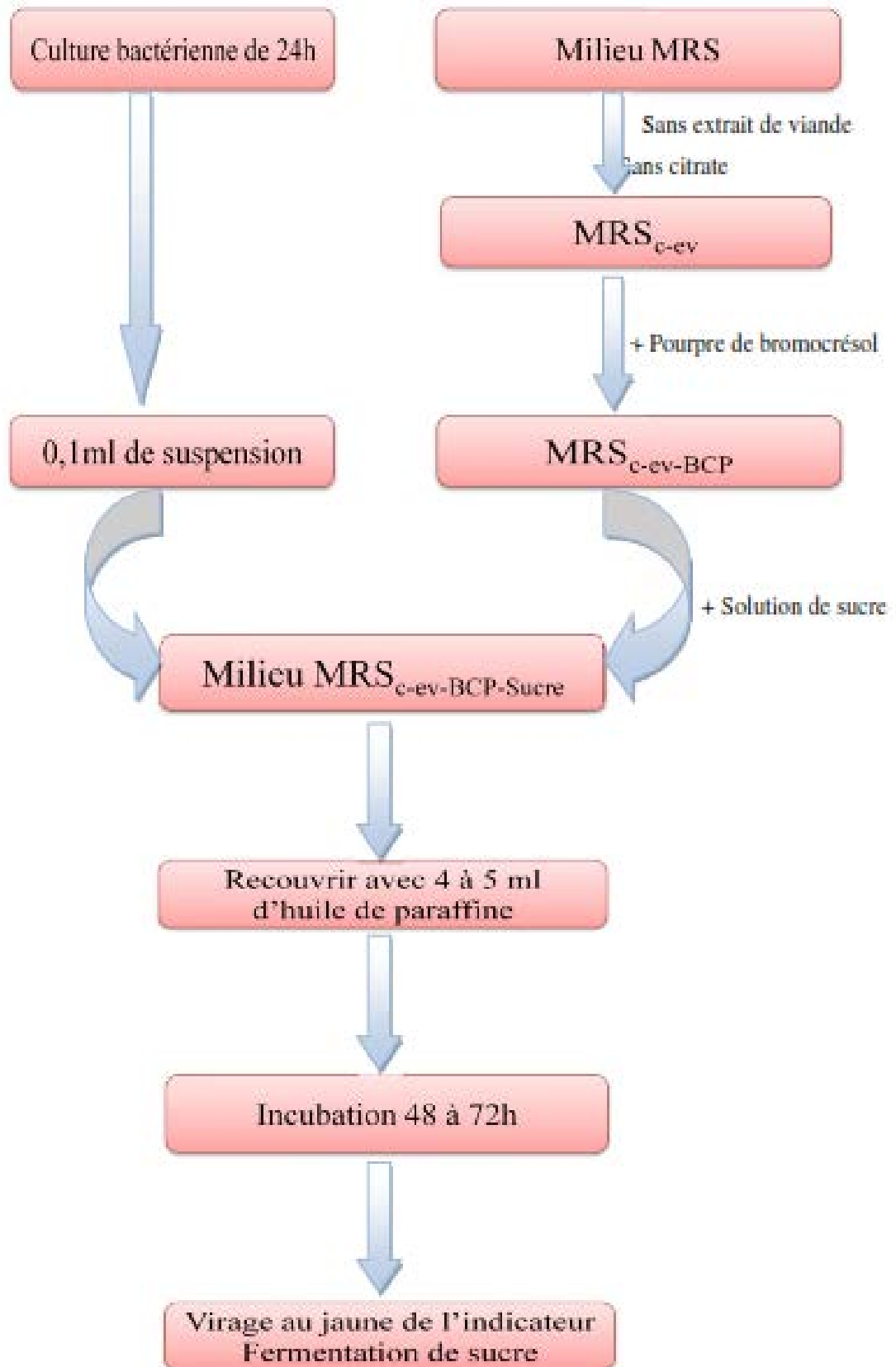


Figure04. Protocole de la fermentation des hydrates de carbones.

Souches		SBO1	SBO2	SBO3	SBO4	SBO5	SBO6	SBO7
Teste								
	4°C 30°C 37°C	+	+	+	+	+	+	+
	45°C	+	+	+	+	+	-	+
Thermorésistance (63,5)		+	+	+	+	+	+	+
ADH		+	+	+	+	+	+	+
acétoïn	VP	-	-	-	-	-	-	-
	RM	+	+	+	+	+	+	+
réductase	1%	+	+	+	+	+	+	+
	3%	+	+	+	+	+	+	+
Typefermentaire		homo	homo	homo	homo	homo	homo	homo

Résultats

1. Isolement et identification :

1.1. Pré identifications des souches :

La morphologie des bactéries lactiques est un critère important pour leur identification dont les dimensions, le contour, la couleur, la viscosité, la pigmentation, l'opacité sont des caractères précieux qui permettent une première approche vers l'identification (**Ana Belen Florez et al., 2006**).

Après la purification des isolats, On a obtenu 10 souches catalase négative et Gram positive qui sont subis un examen macro-microscopique.

1.2. Dénombrement :

Après avoir réalisé plusieurs dilutions, on a pris en considération deux dilutions 10^{-4} et 10^{-5} dont le nombre de colonies est entre 30 et 300 (figure05).

A l'aide de la formule mathématique (figure05) on a trouvé un nombre $267,272727 \cdot 10^{-5}$ UFC/g de l'orge (la formule est démontrée dans la partie de matériel et méthodes)

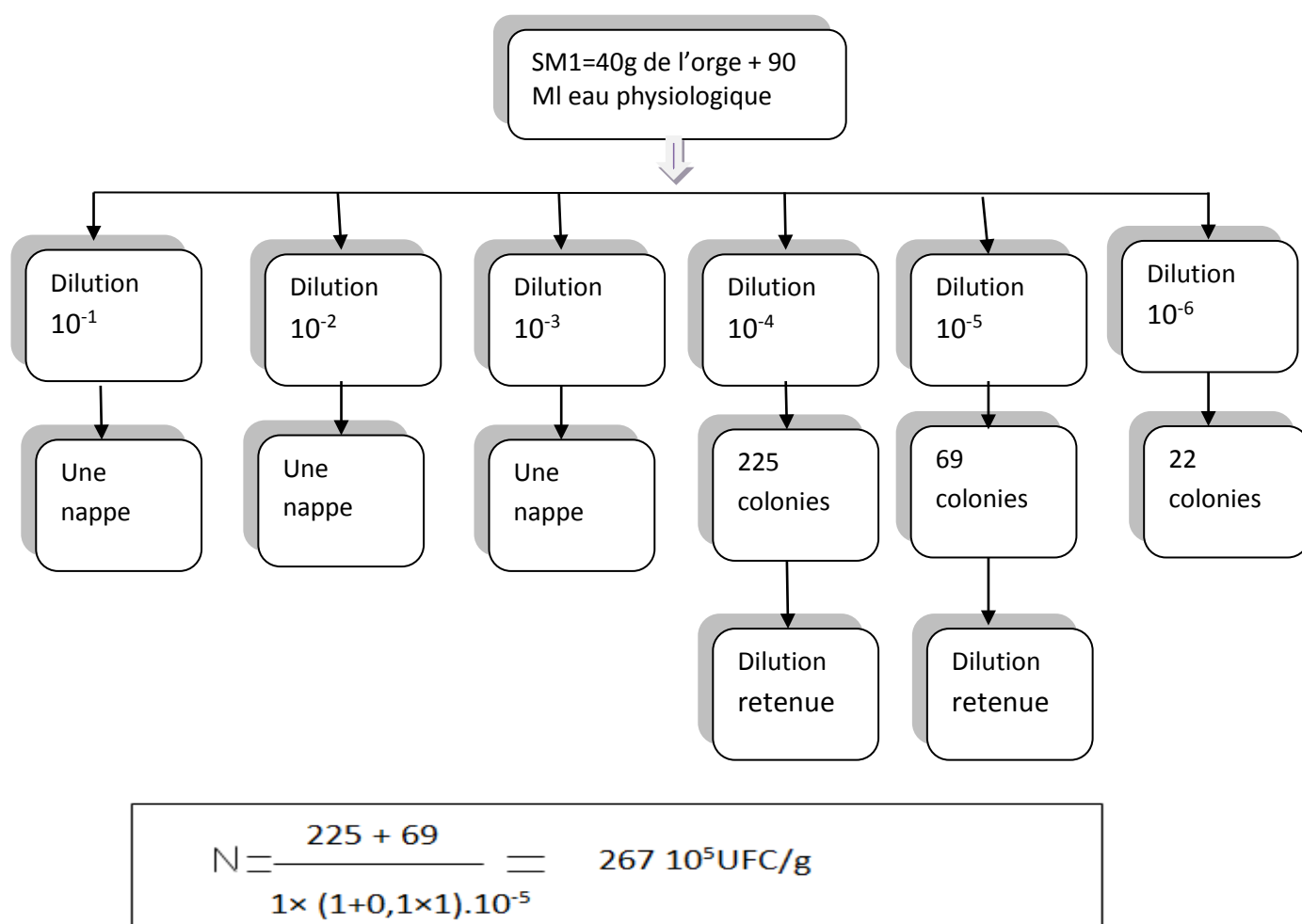


Figure 05: dénombrement sur milieu MRS des bactéries lactiques isolées de l'orge

1.3. Etude macroscopique :

Après incubation, l'examen macroscopique sur la gélose MRS et M17 montre des colonies bien isolées avec un relief bombé ou plat, régulières ou irrégulières, de couleur blanchâtre ou jaunâtre, d'aspect crémeuse ou gluante, leur taille est d'environ 0,5mm à 3mm de diamètre. Le résultat de l'examen macroscopique est illustré dans le (tableau 04)

1.4. Etude microscopique :

Après la réalisation de la coloration de Gram, les souches ont été observées sous le microscope optique (tableau 05)

Toutes les bactéries étudiées se sont révélées Gram +, 8souches 80% sont sous forme coccis et 20% souches sont forme bâtonnet figure

- Les bacilles se présentent sous forme de bâtonnets courts et parfois long, isolés ,ou sous forme de chaînes court figure
- Les coques sont disposées en tétrade, en paire, groupées en amas et parfois en courtes chaînes figure tableau

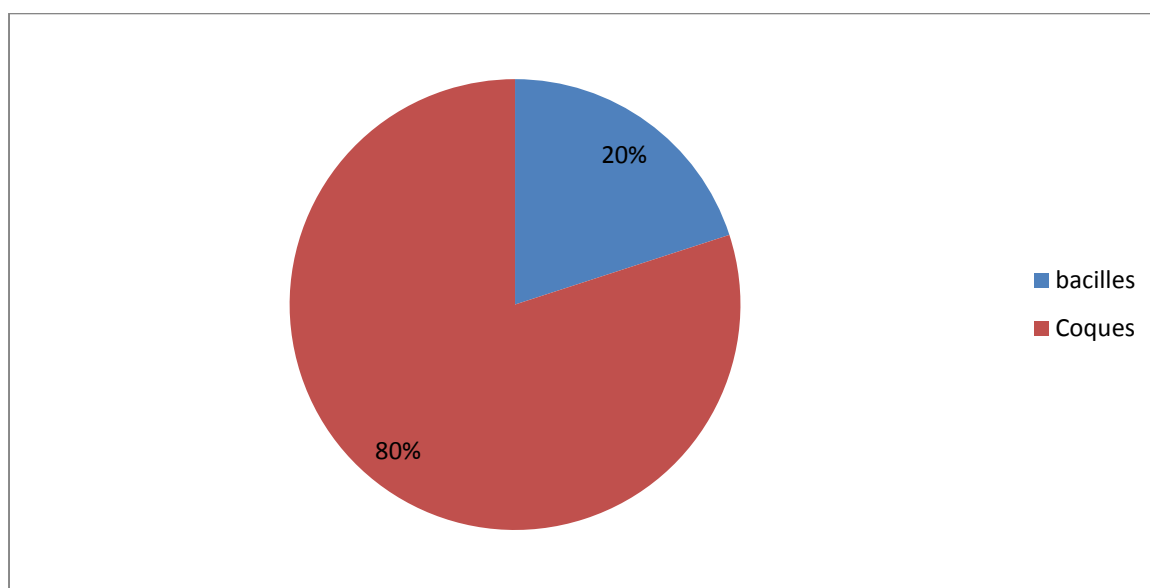


Figure 06 : les proportions des bactéries lactiques isolées de l'orge

Résultats

Tableau 04 : Aspects macroscopiques des colonies bactériennes et test de la catalase.

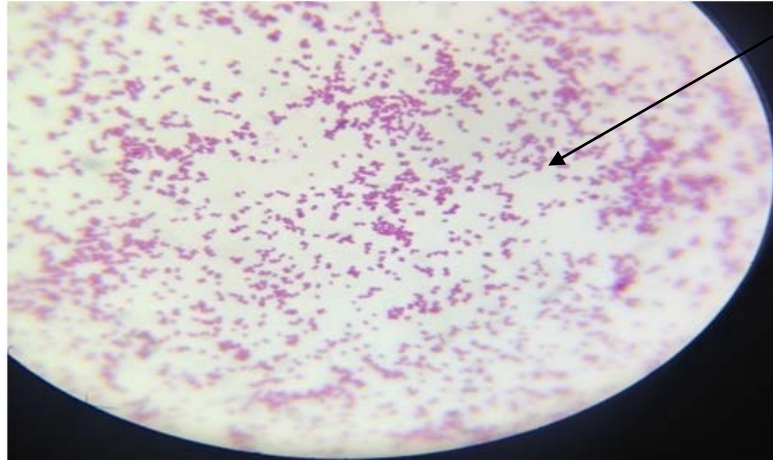
La souche	Catalase	La forme	La couleur	L'aspect	La taille
SBO 01	-	Régulier	blanchâtre	crémeuse	Petite (1-2 mm)
SBO 02	-	Régulier	blanchâtre	crémeuse	Petite (0,5-1 mm)
SBO	-	Régulier	Translucide jaunâtre	gluante	Moyenne (1-2 mm)
SBO	-	Régulier	blanchâtre	crémeuse	Moyenne (2-3 mm)
SBO	-	irrégulier	Blanchâtre ou jaunâtre	crémeuse	Moyenne (1-2 mm)
SBO	-	Régulier	blanchâtre	crémeuse	Moyenne (1-2 mm)
SBO	-	Régulier	blanchâtre	crémeuse	Petite (0,5-1 mm)
SBO	-	irrégulier	blanchâtre	crémeuse	Petite (0,5-1 mm)
SBO	-	Régulier	Blanchâtre brillante	crémeuse	Moyenne (1-2 mm)
SBO	-	irrégulier	blanchâtre	crémeuse	Petite (0,5-1,5 mm)

Tableau 05 : Aspects microscopiques des souches bactériennes issues de l'orge.

isolats	Gram	Forme	Arrangement
SBO1	+	Coccis	Diplocoques ou tétrades
SBO2	+	Batonnets	Chainettes
SBO3	+	Coccis	Chainettes
SBO4	+	Coccis	Diplocoques ou chainettes
SBO5	+	Coccis	Diplocoque
SBO6	+	Coccis	Diplocoques ou chainettes
SBO7	+	Bâtonnets	Isolées ou paires
SBO8	+	Coccis	Diplocoques

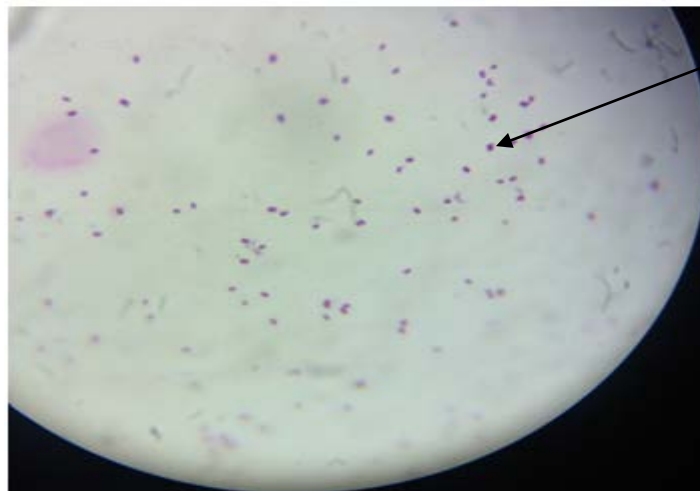
Résultats

SBO9	+	Coccis	Tétrades ou diplo ou chainette
SBO10	+	Coccis	Diplocoques ou chainettes



Coccis tétrade, diplocoques

Figure 07 : l'observation microscopique de la souche SBO1 purifiée



Coccis diplocoque

figure08 : l'observation microscopique de la souche SBO5 purifié

Bâtonnets chainette

Résultats



Figure 09 : l'observation microscopique SBO2 purifié

1.5. Etude biochimique :

1.5.1. Test de catalase :

L'étude de catalase a montré que toutes les souches isolées sont catalase négative (un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (**Bekhouché Farida, 2006**). Ce qui montre que ces dernières appartiennent probablement au groupe des bactéries lactiques. Les 10 souches sélectionnées ont été catalase négative (voir le tableau 04)

1.5.2. Croissance à différentes températures :

Après incubation à 4°C, 30°C et 37°C, toutes les souches (d'SBO1 à SBO10) sont capables de se multiplier. Par contre à la température de 45°C, on a remarqué que la croissance de 9 souches (SBO1, SBO2, SBO3, SBO4, SBO5, SBO7, SBO8 et SBO9 et ah 10).

La plus part des souches sont thermorésistantes, où nous observons une croissance sur le bouillon MRS après un traitement thermique pendant 30 minutes à 63,5°C. Cependant, seulement 1 souches (SBO9) parmi les 10 sont dépourvues de la thermorésistance



Résultats

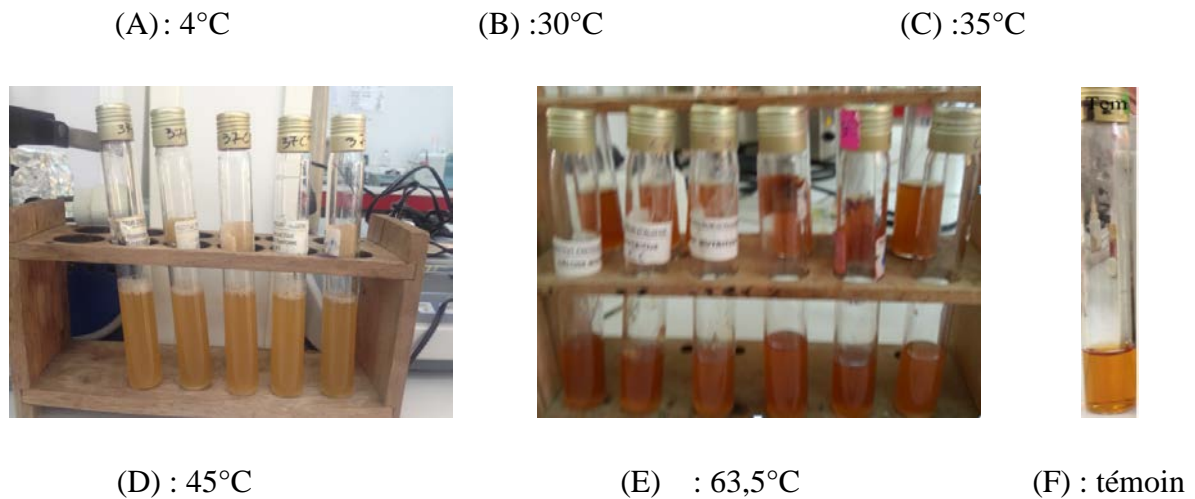


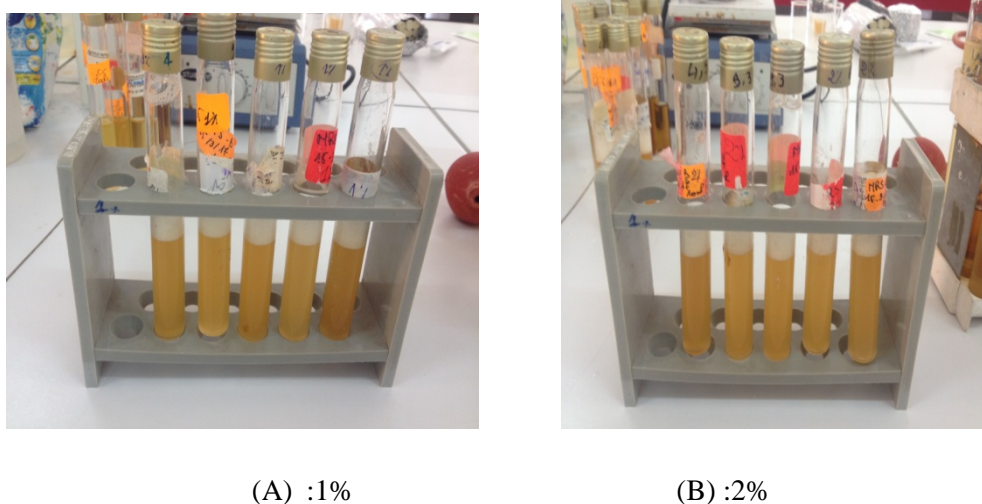
Figure 10 : la croissance des souches isolées a différentes températures

1.5.3. Croissance à différentes concentrations de NaCl :

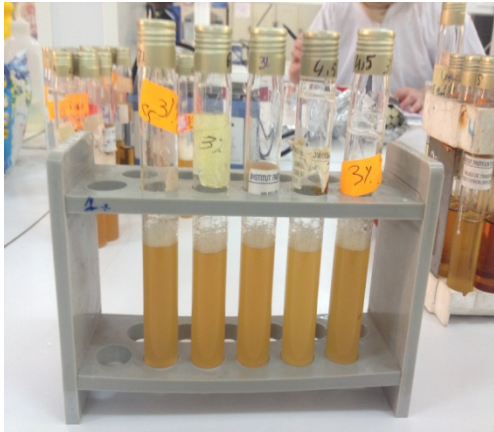
Ce test a révélé que la majorité de nos souches sont capables de résister à des concentrations 2% 1%, 3% et 6,5% de Na Cl (tableau 06)

Selon L .Axelsson (2004), Pilet et al(2005) et Khedid.k et al(2006) ; les genres *Pediocoques* et les *Enterocoques* ont la capacité de croitre dans un milieu de 6,5% en NaCl , alors que les *Lactocoques* et les streptocoques sont sensibles à cette concentration .

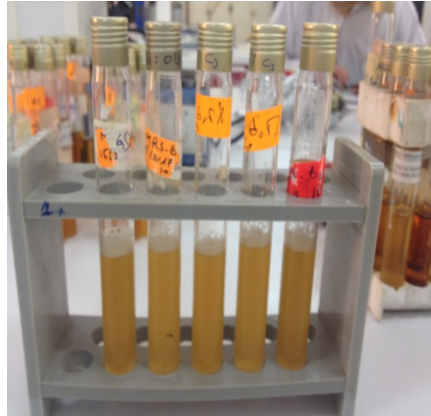
En comparant ces descriptions avec nos résultats, on peut présumer que les souches coques qu'on a isolées sont soit des *Enterocoques* ou des *Pediocoques*.



Résultats



(C) :3%



(D) :6,5%

Figure 11 : effet de défferente concentrartion d'NaCl sur la croissance des bactéries lactiques isolée

1.5.4. Croissance à différentes PH

Une croissance de la plus part des souches sur le bouillon MRS à pH 9,3 a été remarquée à l'exception de 3 souches (SBO2, SBO6, et SBO7). Par contre, seulement 2 souches de bactéries lactiques (SBO4 et SBO9) possèdent la capacité de croissance à pH 4,5.

On rappelle que tous les souches sont capables de se multiplier à pH 6,5 les résultats sont illustrés dans le tableau 06

Tableau 06 : résultats des tests du milieu hyper salé et milieu différentes PH chez les souches isolées

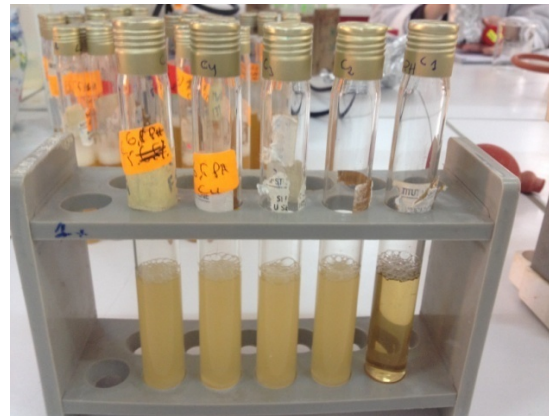
Les souches	Croissance à différentes concentration de NaCl				Croissance à différentes PH		
	1%	2%	3%	6,5%	4,5	6,5	9,3
SBO1	+	+	+	+	-	+	+
SBO2	+	+	+	+	+	+	-
SBO3	+	+	+	+	+	+	-
SBO4	+	+	+	+	+	+	-
SBO5	+	+	+	+	-	+	+

Résultats

SBO6	-	+	-	-	-	+	+
SBO7	+	+	+	+	-	-	-
SBO8	+	+	+	+	-	+	+
SBO9	+	+	+	+	+	+	+
SBO10	+	+	-	+	-	+	+



(A): 4,5



(B): 6,5



(C): 9,3

Figure 12 : effet de défferente pH sur la croissance des bactéries lactiques isolée

1.5.5. Le lait bleu de Sherman :

Résultats

Pour la concentration 1% ; toutes les souches coccis ont pu croître, elles ont coagulé le lait et réduit le milieu (figure

Pour la concentration de 3% ; toutes les souches coccis ont pu croître, elles ont coagulé le lait et réduit le milieu (figures 13 et 14).



Figure 13 : résultats du test de lait bleu de sherman

0,1%

Figure 14 : résultats du test de lait bleu de

sherman 0,3%

1.5.6. Le type fermentaire :

Les résultats de ce test ont montré que toutes les souches testées ne produisent pas de (CO_2) par la fermentation du glucose, donc c'est des bactéries lactiques homofermentaire

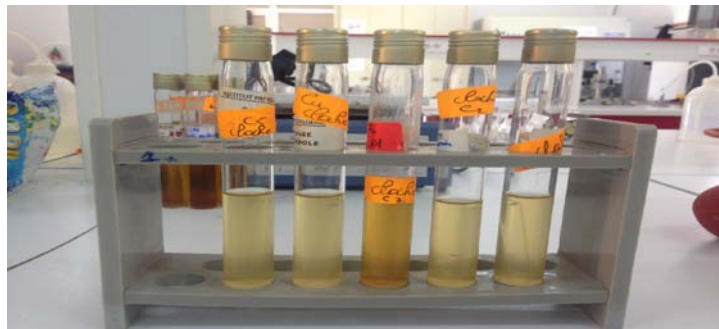


Figure 15 : test de type fermentaire des différentes souches lactiques après 48h d'incubation

1.5.7. Production d'acétone (VP/RM) :

D'après nos résultats obtenus, toutes les souches (de SBO1 à SBO10) sont incapables de produire l'acétone car elles sont VP(-) / RM(+).

Résultats

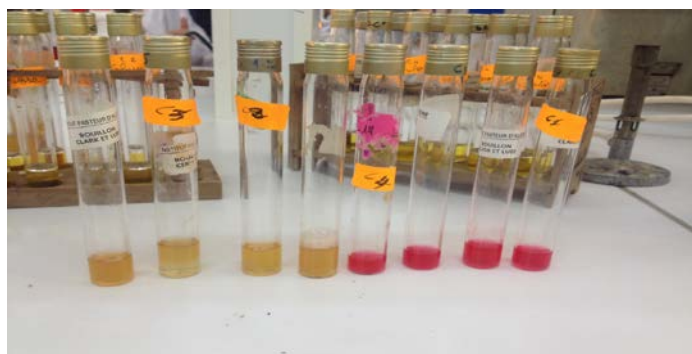


Figure 16 : test de production d'acétoïne après 24h d'incubation

1.5.8. Hydrolyse de l'arginine (ADH) :

La mise en évidence de cette enzyme est intéressante pour la caractérisation des bactéries lactiques (**Badis et al. 2005**). Les bactéries ayant l'enzyme ADH vont alcaliniser le milieu après son acidification et garder une couleur violette. Par contre, les bactéries négatives à ce test ont une couleur jaune. D'après nos résultats, toutes les souches (de SBO à SBO10) sont ADH positifs.

1.5.9. Production de dextrane :

Ce test est directement visualisable après une incubation de 48h à 30°C sur gélose MSE (hypersaccharosée) par la présence de colonies larges, visqueuses et gluantes et permet surtout d'identifier le genre *Leuconostoc* (**Axelsson, 2004**).

Les résultats obtenus montrent que tout les souches ne produit pas dextrane

1.5.10. Fermentation des sucres :

tableau07 : montre les résultats obtenus pour la fermentation des différents sucres :

Souches \ sucres	SBO1	SBO2	SBO3	SBO4	SBO5	SBO6	SBO7	SBO8	SBO9	SBO10
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Cellubiose	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+

Résultats

Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mellibiose	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 08 : le résumer des différents testes d'identification des souches lactiques isolées

Souches		SBO1	SBO2	SBO3	SBO4	SBO5	SBO6	SBO7	SBO8	SBO9	SBO10
Teste											
Catalase		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
température	4°C 30°C 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45°C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	63,5 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ph	4,5	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
	6,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9,3	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
thermorésistant		+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
ADH		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl	1%	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	2%	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	3%	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
	6,5%	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
acétoin	VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Résultats

réductase	1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
dextrane		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
amylase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gélatinase		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
caseinase		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Typefermentai		homo	homo	homo	homo	homo	homo	homo	homo	homo	homo

1.6. Répartition des souches :

L'étude des caractères cultureux physiologiques, biochimiques et enzymatiques des 10 souches lactiques isolées est basée sur des critères d'identification préconisés par (**Axelsson, 2004; Guessas *et Al.*, 2012**); nous avons pu identifier nos souches et les répartir comme suit:

Tableau 09 : Répartition des souches isolées à partir de l'orge

Souche	Pourcentage	Genre
SBO2, SBO7	20%	Lactobacillus
SBO1,SBO3 ,SBO5 ,SBO8 , SBO10	50%	Enterococcus
SBO6	10%	Lactococcus
SBO4 , SBO9	20	Pediococcus

Résultats

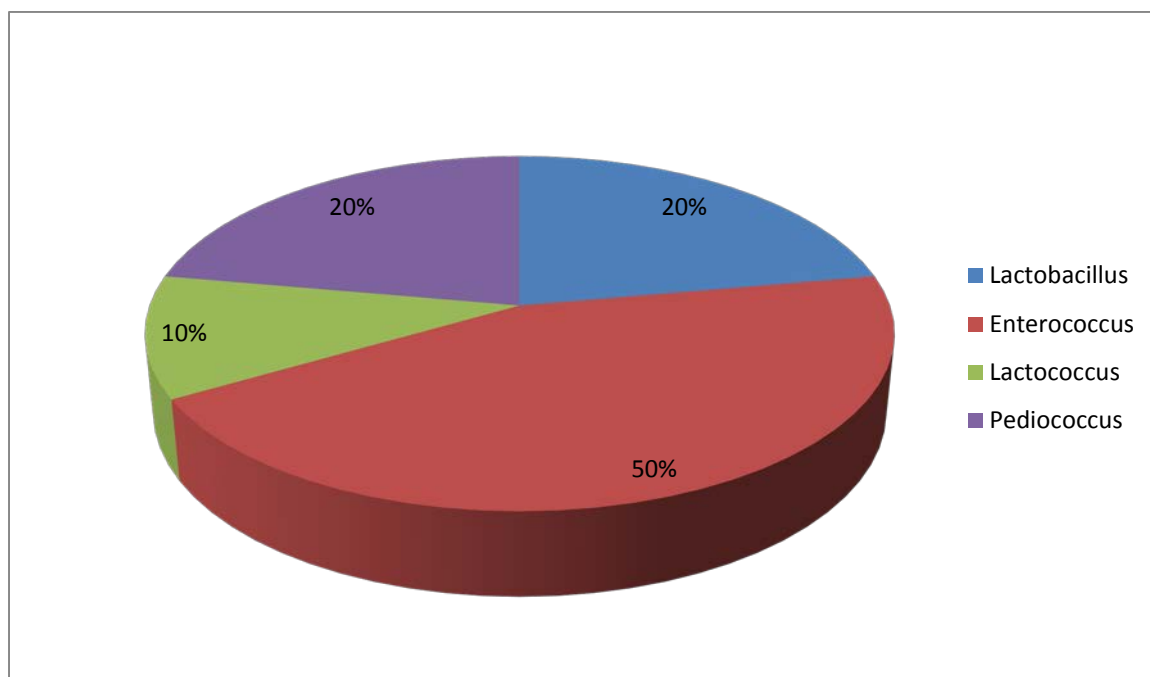


Figure 17 : Répartition des souches lactiques au niveau du genre

Discussion

1. Isolement et identification des souches

Dix souches de bactéries lactiques ont été isolées de l'orge. Elles ont été cultivées et isolées sur milieu MRS, M17 et MSE. Du fait des exigences nutritionnelles des bactéries lactiques, les milieux de culture doivent être très riches en sucres, en matières azotées et surtout en facteurs de croissances (**Pilet et al, 2005**).

La présence de divers genres de bactéries lactiques dans l'orge était prévisible car des bactéries lactiques ont été trouvées dans la microflore de toutes les céréales (**Lhuillier, 2007**).

L'étude des principaux caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques ont montré une diversité de genres et d'espèces isolées à partir l'orge << *Hordeum vulgare*>>

Les résultats d'identification de cette étude montrent une présence majoritaire de coques avec 80% par rapport aux bâtonnets qui ont été trouvées à un pourcentage de 20%. Nous pouvons dire que l'orge possède la même qualité bactériologique que le blé fermenté et bien entendu que le blé dur.

Cette dominance des coques a été décrite par plusieurs auteurs. (**Harun-ur-Rashid et al., 2007**) ont étudié les bactéries lactiques isolées à partir d'un lait fermenté traditionnel (Dahi) et ont observés que les coques était dominantes 73% par rapport aux lactobacilles 27%. Les mêmes résultats ont été rapportés par (**Sengun et al, 2009**) qui ont constatés la dominance des coques sur les bacilles dans un aliment fermenté traditionnel Turque (T'ahana). (**Samet-Bali et al., 2012**) ont étudiés les bactéries lactiques isolées à partir d'un lait fermenté traditionnel « Leben » et qui ont observés aussi que les coques était dominantes comme *Enterococcus*, *Lactococcus*.

La flore dominante est représentée par les entérocoques (50%), macroscopiquement ces bactéries forment sur milieu MRS solide des colonies bombées, circulaire, surface lisse et de couleur blanche environ 0,5 à 1 mm de diamètre. L'aspect microscopique des souches après coloration de Gram a révélée des coques associées en deux ou courte chaine (**Franz et Holzapfel ., 2004**).

Les *Entérocoques* poussent dans les conditions hostiles, en présence de 6.5% NaCl, à pH 9,6, croissance à 45°C et survivent généralement 30 min à 60°C (**Stiles et Holzapfel ., 1996** ; **Larpent et al., 1997**).

Discussions

L'identification des espèces d'*Enterococcus* repose sur le profil fermentaire, mais dans notre étude les sucres utilisés ne nous permettent pas une identification précise de l'espèce. D'après **Franz et Holzapfel (2004)** l'utilisation de l'identification phénotypique traditionnelle pour caractériser les espèces devient extrêmement difficile, si pas impossible.

L'aspect macroscopique a montré que les *Lactocoques* apparaissent comme des petites colonies de 1 à 2 mm de diamètre à contour régulier, de couleur blanchâtre, lisses et légèrement bombées.

Microscopiquement, elles sont des Gram positif, de forme cocci sphérique, associées en paires ou en chaînes, plus aux moins longues (**Teuber et Geis., 2006**).

Selon **Teuber et Geis, 2006 ; Stiles et Holzapfel., 1997**, les *Lactocoques* sont des bactéries homofermentaires, ne poussent pas à 45°C, et ne poussent en présence de 6,5% NaCl. Au cours de cette étude, nous avons isolé des souches ayant les mêmes caractéristiques précédentes et poussent aussi après un traitement de 63°C pendant 30 min (**Bensalah, 2006**), comme sont incapables de produire l'acétone.

D'après ces caractéristiques on conclue que ces souches étaient identifiées *Lactococcus*.

Dans cette étude nous avons isolé deux souches de *Lactobacillus*. D'après l'observation macroscopique faite sur milieu MRS (**Man et al., 1960**), on a remarqué que les colonies sont de forme régulière, de couleur blanchâtre, d'aspect crémeux et de 1 à 1,5 mm de diamètre, et l'observation sous microscope après coloration de Gram, indique qu'il s'agit de bacilles apparents Gram positif (**Klein et al., 1998; Axelsson, 2004; Hammes et Hertel, 2006; Tabasco et al., 2007**).

Il a été possible d'identifier le genre *Pediococcus* grâce à leur aspect microscopique (association) et leur type fermentaire : tétrades homofermentaires (**Bergy's manual, 2009**).

Les deux souches sont thermophiles (développent à 45°C), capables de se pousser à PH (9,3), acétone négatif, cependant l'un des deux souches (SBO4) est thermorésistante.

Notre étude expérimentale nous a conduits à une réparation de souche de bactéries lactiques riche par a port au blé normale. Sa flore bactérienne lactique présente un taux similaire au blé fermentée

Ces bactéries lactiques sont *Lactobacillus.sp* (20%), *Entérocooccus.sp* (50%), *Lactococcus* (10%), *Pédiococcus* (20%). Ces bactéries lactiques non pas été isolées et identifier dans le blé dur

Discussions

Ces bactéries lactiques confèrent à la graine d'orge des caractéristiques nutritionnellement pour la santé de l'intestin particulièrement le colon.

L'orge est un céréale peu consommé par la population Algérienne au raison de l'insuffisance des parcelle de récolte par-à-port au blé dur. Il a tous jours était un produit culinaire artisanale dans le milieu rurale. Il est souhaitable de promouvoir la culture céréalienne de l'orge, à fin que ses vertus nutritionnellement et diététiques soi profité par une large population dans notre pays.

D'autre études pourrait être exploitées à fin de montré les caractéristiques physiologiques, biochimiques et nutritionnelle de l'orge, l'analyse moléculaire par PCR pourrait mieux nous révéler la flore bactérienne endogène de l'orge.

Ce si pour conclure que l'orge est bénéfique pour la physiologie du colon.

Conclusion

Conclusion :

Notre étude a porté sur l'isolement, purification et l'identification des bactéries lactiques à partir de l'orge «*Hordeum vulgare*». Nous avons isolé 10 souches, dont on a étudié les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Les résultats des testes microbiologiques classiques ont permis une pré-identification de plusieurs genres et espèces. L'identification des souches a été réalisé en suivant les recommandations de A.BADIS *et al.*, (2005) et KHEDID *et al.*, (2006).

La totalité de nos souches a été des coques appartenant aux trois genres *Enterococcus* (50%) et *Lactococcus* (10%), *Pediococcus* (20%) , suivie de l'espace *Lactobacillus* (20%) 90% de nos souches sont thermophiles, et résiste à des concentrations élevées des NaCl. Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives.

Dons pour compléter ce travail sur l'orge, nous proposons :

Sur le plan technique, l'utilisation des techniques moléculaires pour une meilleure précision et signification de la microflore présente.

Sur le plan technologique, les souches de bactéries lactiques isolées peuvent faire l'objet :

- D'une étude du comportement vis-à-vis des traitements de conservation, la congélation et la lyophilisation.
- D'une meilleure caractérisation des activités enzymatiques des souches bactériennes
- D'une étude in vivo des propriétés probiotiques des souches possèdent des bonnes aptitudes technologiques (par exemple l'adhésion aux cellules épithéliales humaines).

D'autre études pourrait être exploitées à fin de montré les caractéristiques physiologiques, biochimiques et nutritionnelle de l'orge, l'analyse moléculaire par PCR pourrait mieux nous révéler la flore bactérienne endogène de l'orge.

Ce si pour conclure que l'orge est bénéfique pour la physiologie du colon.

Références Bibliographiques

➤ *A*

- **Ammor Mohammed Salim** (2004). Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison :#Identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de Doctorat en physico-chimie et#qualité des bioproduits. Université de Rennes 1-France.
- **Ananou S, Maqueda M, Martinez-Bueno M, Gavez A and Valdivia E** (2007). Bactericidal AS#48 and chemical preservative against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas#aeruginosa*. *Lett Int Appl Microbiology*.
- **Anas M, Boumehira AZ, Henni JE, Hamedi AR and Kihal M** (2012). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus#aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* . *African Journal of Biotechnology*, Vol 11(20): 4595-4606.
- **Andrieu J, Demarquilly C** (1980). prévision de la valeur nutritive des aliments des ruminants. institut national de la recherche agronomique, ISBN/2- 85340 -357 0.paris: 448.
- **Appert J** (1985). Le stockage des produits vivriers et semenciers: Le technicien de l'agriculture tropicale. Ed Maisonneuve et Larose Centre technique de coopération agricole#et rurale: 98.
- **Aubert, C. (1985)**. Les aliments fermentés traditionnels. Ed. Terre Vivante, Paris : 252
- **Axelsson L.T., Chung T.C., Dobrogosz W.Z. and Lendgren S** (1989). Production of a broad#spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Micro. Eco. Health Dis.*, 2:#131-136
- **Axelsson Lars** (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology In *Lactic Acid#Bacteria Microbiological and Functional Aspects*. Salminen S., Wright A.v., Ouwehand A.#3e Ed., Marcel Dekker : 1-66

➤ *B*

- **Badis A., Guetarni D., Moussa Boudjema B., Henni D.E and Kihal M** (2004). Identification#and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four#Algerian races. *Food Microbiology*, 21: 579-588
- **Badis, A., Guetarni, D., Kihal, M. et Ouzrout, R** (2005).Caractérisation phénotypique#des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales#Arabia et Kabyle». *Scien &Tech*, 23 : 30-37.
- **Bagnicourt M** (1995) : Dictionnaire de microbiologie médicale, 2^{ème} édition. Masson, Paris : 22-23.
- **Bahorun T** (1997). Substances naturelles actives La flore Mauricienne une source#d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research council Mauritius :#83-94.

Références Bibliographiques

- **Bartali EH, Parsons E et Vertraeten Ch** (1994). La conservation des denrées: cas des#céréales#In: agronomie moderne bases physiologique et agronomique de la production#végétale T E#Ameziane et person (eds). Hatier-Aupelf-Uref (ed) : 465-486.
- **Bekhouché F. et Boulahrouf A** (2005). Etudes quantitative et qualitative des bactéries#lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant a six stations d'élevage de#Constantine. Sciences & Technologie., 23: 38-45
- **Bekhouché Farida** (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et microorganismes# pectinolytiques des olives noires et vertes: Isolement et identification biochimique.Evaluation et optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase, Thèse de#doctorat d'état :#272-829
- **Benbelkacem A** (2007). Les triticales: cultures performances et différentes possibilités d'utilisation en Algérie. Journée techniques sur le culture du triticales en zone semi aride et son utilisation par les animaux domestique: Oum Elbouagui-Elkhroub. 17-18 Juin 2007.
- **Bey F** (2009). Etude de l'interaction antagoniste entre Lactobacillus sp. et quelques souches#d'entérobactéries. Mémoire de Magistère en Microbiologie Alimentaire et Industrielle.#Université d'Oran Es-Senia
- **Bissonnette F, Labrie S, Deveau H, Lamoureux M and Moinau S** (2000).# Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged#Cheddar cheese .J Dairy Sci, 83: 620 - 627.
- **Björkroth J. and Holzappel W** (2006). Genera Leuconostoc, Oenococcus and Weissella.The prokaryotes, 4: 267-319.
- **Bolduc MP, Raymond Y, Fustier P, Chalpagne CP and Vuilleumard JC** (2006). Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non -fermented pasteurized milk#Int .Dairy J, 16 :1038 -1038.
- **Bonneau L** (2003). Information technique sur le blé Boulangerie.< <http://WWW.Boulangerie.net/MP/Infoblefar.html>.
- **Bottazzi V** (1988). An introduction to rod-shaped lactic bacteria, Biochimie, 70: 303-315
- **Boulal H, Zaghouane O, EL Mourid M et Rezgui S** (2007). Guide pratique des céréales#l'automne (blé et orge) dans le Maghreb : 171-176.
- **Bourel G, Henini S, Krantar K, Oraby M, Diviès C et Garmyn D** (2001). Métabolisme#sucre-citrate chez Leuconostoc mesenteroides. Lait 81 : 75-82
- **Bourgeois P, Renault P, De Roissart H et Rouvier C** (1994). Méthodes d'identification#des bactéries lactiques In Bactéries lactiques. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Lorica : 141-160

Références Bibliographiques

➤ C

- **Carr Frank J, Chill Don and Maida Nino** (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4): 281-370
- **Collins M.D, Farrow J.A.E, Phillips B.A, Feresu S and Jones D** (1987). Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 37: 310-316.
- **Cotty PJ and Bhatnagar D** (1994). Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* stains to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzyme. *Appl Environ Microbiol* n°60 : 2248-2251.
- **Curk M.C, Boeufgras J.M, Decaris B, Gavini F, Kersters K, Larpent J.P, Le Cuvelier C, Dotreppe O et Tstress L** (2003). Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann Méd Vet*, 147: 315-324.

➤ D

- **De Roissart H** (1986). Bactéries lactiques In Ecosystème microbien d'un atelier fermier de salaison identification et propriétés des bactéries lactiques. Thèse de doctorat. Université de Rennes-France.
- **Desmazeaud M.J et De Roissart H** (1994). Métabolisme général des bactéries lactiques. In *Bactéries lactiques*. De Roissart H., Luquet F.M. Tome 1, Lrica : 169-207
- **Devoyod J et Poullain F** (1988). Les Leuconostocs Propriétés: leur rôle en technologie laitière, *Le Lait*, 68 (3) : 249-280
- **Devoyod J and Muller M** (1969). La flore microbienne du fromage de Roquefort, III Les streptocoques lactiques et les leuconostoc, Influence de différents microorganismes de contamination *Le Lait* : 369-399.
- **Djermoun A** (2009). La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. *Nature et Technologie*, 01 : 45-53.
- **Dortu Carine et Thonart Philippe** (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(1): 143-154
- **Drider D, Fimland G, Héchard Y, Mc Mullen L.M and Prevost H** (2006). The continuing story of class IIa bacteriocin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70 (2): 564-582

➤ E

Références Bibliographiques

- **Eom H-J, Seo D.M and Han N.S** (2007). Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* spp. producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. *Int .J. Food Microbiol.*, 117: 61-67

➤ *F*

- **Facklam R and Elliot J.A** (1995). Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci. *Clinical Microbiol. Reviews.*, 8: 479-495
- **Favier JC** (1989). valeur nutritive et comportement des céréales au cours de leur transformation PDF. *Céréales en régions chaudes: AUPLLF-URFF Eds John libbey Paris* : 285- 287
- **Ferrari J** (2002). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne.
- **Fleming H.P, Etchells J, Costilow R. N** (1975). Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber Brines. *Appl Microbiol.*, 30(6): 1040-1042
- **Franz Charles M.A.P et Holzapfel Wilhelm. H** (2004). The Genus *Enterococcus*: Biotechnological and Safety Issues In Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Salminen S., Wright A.v., Ouwehand A. 3e Ed., Marcel Dekker :199-230

➤ *G*

- **Garvie E.I** (1986). Gram positive cocci - Genus *Leuconostoc*. In: *Bergeys' Manual*, 9th edit., the Williams and Wilkins Co., Baltimore : 1071-1075
- **Gildo P** (2006). Précis de phytothérapie. Edition Alpen : 3-4.
- **Giraffa G, Carminati D and Neviani E** (1997). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.*, 60: 732-737
- **GLEDEL J .** (1988). Les salmonelles. In : *microbiologie alimentaire*. Vol. I. Ed : LAVOISIER, Paris : 51-53.
- **Gravesen A Ramnath M, Rechinger K. B, Andersen N, Jansch L, Hechard Y, Hastings J.W and Knochel S** (2002). High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology.*, 148: 2361-2369
- **Guessas B, Adjoudj F, Hadadji M and Kihal M** (2012). Isolation and identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Their Major Technological Traits. *World Applied Science J* (17)4: 480-488.
- **Guessas B et Kihal M** (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from

Références Bibliographiques

Algerian arid zone raw goat's milk .African .Journal of Biotechnology 3(6): 339-342

- **Guiraud JP** (2003). Microbiologie alimentaire: Série agro-alimentaire. Ed Dunod : 696.
- **Guiraud, J.P** (1998). Microbiologie des principaux produits alimentaires, Microbiologie alimentaire. Ed ©Dunod, Paris.
- **Gurira O.Z, Buys E.M** (2005). Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. Food Microbiology., 22: 159-168

➤ *H*

- **Hammes W and Hertel C** (2006). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. The Prokaryotes, 4: 320-403.
- **Harrigan W.F and McCance M.E** (1976). Eds., Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, Orlando.
- **Harun-ur-Rashid M, Togo K, Ueda M, and Miyamoto T** (2007). Identification and characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk (Dahi) in Bangladesh World J Microbiol Biotechnol, 23:125-133.
- **Hemme D, Foucaud-Scheunemann C** (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. International Dairy Journal., 14: 467-494
- **Hwanhlem N, Buradaleng S, Wattanachant S, Benjakul S, Tani A and Maneerat S** (2011). Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. Food Control., 22: 401-407

➤ *I*

- **Izquierdo E, Wagner C, Marchioni E, Aoude-Werner D and Ennahar S** (2009). Enterocin 96, a novel Class II bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* WHE 96, isolated from Munster cheese. Appl. Env. Microbiol., 75(13): 4273-4276

➤ *J*

- **Joffraud J, Cardinal M, Cornet J** (2006). Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold smoked salmon. International Journal of Food Microbiology., 112: 51-61.

➤ *K*

Références Bibliographiques

- **KABEL, Mirjam A, VAN DER MAAREL, Marc J.E.C, KLIP, Gert, VORAGEN, Alphons G.J., SCHOLS, Henk A** (2006). Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulase preparations towards plant materials. *Biotechnology and Bioengineering* [en ligne], janvier 2006, vol. 93, n°1, p. 56-63. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20685>
 - **Kim K H, Tsao R, and Cui SW** (2006). Phenolic acid profile and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect hydrolysis conditions. *Food Chem*, 95: 466.
 - **Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G** (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria *International Journal of Food Microbiology*, 41: 103-125
- *ℒ*
- **Lancefield R.C** (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exper. Med.*, 57: 571-595
 - **Larpent JP** (1996). Les bactéries lactiques. In *Microbiologie alimentaire: Aliments fermentés et fermentations alimentaires*, tome 2. Second Edition. (eds: Bourgois CM, and Larpent JP) Ed: Tec et Doc Lavoisier Paris : 6-33.
 - **Larpent JP et Larpent MG** (1990). Memento technique de microbiologie. Second ED technique et documentaire Lavoisier : 417-420.
 - **Larpent J-P** (1996a). Les bactéries lactiques In *Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires*. Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, Tec & Doc, Lavoisier: 4-33
 - **Larpent-gourgaud M, Michaux O, Larpent JP, Desmasures N, Desmazeaud M, Larpent-Gourgaud Monique, Michaux odile, Lrpent J.P, Desmasures Nathalie, Desmazeaud Michel, Mangin Irène, Masson Florence, Montel M.C et Tailliez Patrick** (1997). Les ferments lactiques et bactéries apparentées In *Microbiologie alimentaire Techniques de laboratoire*. Larpent J-P. Tec & Doc, Lavoisier : 199-255
 - **Leveau J-Y, Bouix Mrielle et De Roissart H** (1991). La flore lactique In *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire*. Bourgeois C.M., Leveau J-Y. Tec & Doc, Lavoisier, pp: 152-186
 - **Leygue JP** (1995). « Amidonnerie de blé ». *Revue I.T.C.F perspective Agricole*, N203, P.VI-X.
 - **LEYRAL G and VIERLING E** (2001). *Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaire*. Ed : Donis, Paris : 100-102.
 - **Lhuillier A** (2007). Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *Agauria salicifolia* Hook. Fex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), Tambourissa.

Références Bibliographiques

- **Ludwig W, Schleifer K-H and Whitman W.B** (2008). Bergey's taxonomic outlines - Revised# Road Map to the Phylum Firmicutes., vol. 3. Disponible# http://www.bergeys.org/#outlines/Bergeys_Vol_3_Outline.pdf

➤ *M*

- **Marchal, N, Bourdon J.L et Richard CL** (1991). Les milieux de culture pour# l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris.
- **Mathot A.G, Beliard E et Thnault D** (1996). Propriétés antimicrobiennes des bactéries#actiques In Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentation alimentaires.#Bourgeois C.M., Larpent J-P. Tome 2, Tec & Doc, Lavoisier : 432-450
- **Mayeux JV, Sandine WWE and Elliker PR** (1962). A selective medium for detecting#Leuconostoc organisms in mixed isolate starter cultures. J Dairy Sci, 45: 56-65.
- **Metchnikoff E** (1908). Prolongation of life: Optimistic studies. William Heinemann, London : 161-183
- **Moëller V** (1955). Simplified tests of some amino acid decarboxylases and for the arginine#lihydrolase system. Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 36: 158-172
- **Multon JL** (1982). Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés:#céréales, protéagineux; oléagineux, aliment pour animaux. Technique et Documentation#Ed Lavoisier paris : 576.

➤ *N*

- **Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR and Krishana, DR** (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, Biochemical effects and Therapeutic Potential.I ndian Journal of Pharmacology, 33: 2-16.
- **Nauciel et Vildé J-L** (2005). Bactériologie médicale. 2^{ème} édition : 1-2, 36
- **Noonpakdee W, Santivarangkna C, Jumriangrit P, Sonomoto K and Panyim S** (2003).#Isolation of nisin-producing Lactococcus lactis and Leuconostoc mesenteroides WNC 20 strain#from nham, a traditional Thai fermented sausage. Int. J. F. Microbiol., 81(2): 137-145
- **Novel G** (1993). Les bactéries lactiques In Microbiologie industrielle : les microorganismes#d'intérêt industriel. Leveau J-Y., Bouix M. Tec & Doc, Lavoisier : 170-374

➤ *O*

- **Ogier J-C, Casalta E, Farrokh C and Saïhi A** (2008). Safety assessment of dairy# microorganisms: The Leuconostoc genus. Int J Food Microbiology., 126: 286-290

Références Bibliographiques

- **Olmedo-Arcega OB and Cantrell RG** (1995). Recurrent selection for grain yield in Durum Wheat. *Crop Scid* N° 35: 714-719. IN: Evaluation de la qualité d'un germolplasma du blé dur (*Triticum durum* Desf) appréciation de l'aptitude technologique et biochimique. Ait Kaki S. (2001). Mémo de Mag. Univ Badji Mokhtar. Annaba.

➤ *P*

- **Paul D. Cotter, Colin Hill and Paul Ross R** (2005). Bacteriocins: developing innate immunity#for food. *Nature Reviews Microbiology.*, 3: 777-788
- **Paul Ross R. Cotter, Colin Hill, Paul D.,** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity#for food. *Nature Reviews Microbiology.*, 3: 777-788
- **Pilet M-F, Magras Catherine et Michel Federighi** (2005). Bactéries lactiques In# Bactériologie alimentaire "compendium d'hygiène des aliments". Federighi M.# *Economica* : 219-242
- **Prats J et Grandcount MC** (1971). Les céréales 2ème éd Coll. d'enseignement Agricole : 288
- **Prescott L. M, Harley J. P and Klein D. A** (1999). *Microbiology*, 4th edn. New York:#WCB/McGraw-Hill.

➤ *Q*

➤ *R*

- **Reed C** (1992). Development of storage techniques: A historical perspective. In *Storage of#Cereal Grains and Their Products*. Chapter 4 : 143-156.
- **Robert J** (1980). Valeur nutritive des aliments, Alimentation des ruminants, Ed INRA#Publication (Route de Saint Cyr) 78000 Versailles dépôt légal n°1281, ISBN 2.85340-288-6 : 557
- **Rodrigues** (2002). In Boudjani, W. (2009). Action de la flore lactique sur les#bactéries contamination. Mémoire d'ingénieur, Institut de biologie, Université de#Tlemcen : 73.

➤ *S*

- **Salminen S, Gorbach S, Yuan-Kun L and Benno Y** (2004). Human studies on probiotics:# What is scientifically proven today? In *Lactic Acid bacteria : Microbiological and#functional Aspects*. Eds salimen S., von Wright A., Ouwerhand A., New york Dekker M : 515-530
- **Samelis J, Maurogenakis F et Metaxopoulos J** (1994). Characterization of lactic acidbacteria#isolated from naturally fermented Greek dry salami, *Inter. J. Food. Microbiol.*, 23: 179-196

Références Bibliographiques

- **Samet-Bali O, Ennouri M, Dhouib A and Attia H.** 2012. Characterisation of typical Tunisian fermented milk. African journal of Microbiology Research, Vol.6 (9): 2169-2175.
- **Schillinger U and Lücke F-K** (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. Food Microbiology., 4: 199-208
- **Sengun IY, Nielsen DS, Karapinar M and Jakobsen M** (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana ,a traditional Turkish fermented food. Int J Food Microbiol, 135: 105-111
- **Sondergaard A.K** (2005). Application of probiotics in food. In Bacteries lactiques et probiotiques. Luquet Francois-Marie, Corrieu Georges. Tec & Doc, Lavoisier : 195-209.
- **Stiles Michael E and Holzapfel Wilhelm H** (1997). Lactic acid bacteria of foods and
 - **T**
- **Tailliez Patrick** (2001). Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a après le 3 milliards d'années. Lait., 81: 1-11
- **Teuber Michael and Geis Arnold,** 2006. The Genus Lactococcus. Prokaryotes 4: 205-228
- **Thierry Souccar** (2006). La face cachée des céréales. <http://www.lanutrition.fr/phpBB2/viewtopic.php?t=38>, Céréales en régions chaudes : conservation et transformation, Aupelf-Uref J Libbey Eurotext : 27-38.
 - **U**
 - **V**
- **Van Belkum M.J, Hayema B.J, Geis A and Kok J., Venema G** (1991). Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. Appl Environ Microbiol 57: 492-498
- **Van Tieghem P.E.L** (1878). Sur la gomme de sucrerie. Ann. Sei. Nat. Bot., 6: 180-202
- **Ventura M and Zink R** (2002). Rapid identification ,differentiation and proposed taxonomic classification of bifidobacterium Lactis. Appl Environ Microbiol, 68: 6429-6434.
- **Vignolo G, Palacios J, Farias M, Sesma F, Schillinger U, Holzapfel W and Oliver G** (2000). Combined effect of bacteriocins on the survival of various Listeria species in broth and meat system. Curr. Microbiol., 41: 410-416
- **Vollenweider S** (2004). 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. Appl. Microbiol. Biotech., 64: 16-27

Références Bibliographiques

➤ W

- **Wheater M.D, Hirsch H and Mattick A.T.R** (1951). Possible identity of « lactobacilline » with hydrogen peroxide produced by Lactobacilli. Nature., 170: 623

➤ X

➤ Y

- **Yateem A, Balba MT, AL-Surrayai T, Al-Mutairi B and Al-Daher R** (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. International Journal of Dairy Science, 3(4): 194-199.

➤ Z

- **Zhoo Z, Robards K, Helliwell S and Blanchard C** (2004). The distribution of phenolic acids in rice. Food chem, 87: 401.2004. In Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. Dykes L, Rooney L W. 2007. Texas A&M university college station TX.
- **Zourari A, Roger S, Chabanet C et Desmazeaud M** (1991). Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. Souches de Streptococcus salivarius subsp. thermophilus. Lait., 71:445-461

Annexe

Annexe I : Composition des solutions de titrage

❖ Solution de NaOH 0,1N :

Eau distillé	1000ml
NaOH	40g

❖ Solution de HCL 1n

Eau distillé	100ml
HCL.....	4ml

Annexe II : Composition des diluants (g/l)

❖ Eau physiologie 9 /ml:

NaCl	9g
Eau distillée	1000 ml

Annexe III : Composition des milieux de cultures (g/l)

➤ Milieux solides

❖ Gélose nutritive standard Plate Count Agar (P.C.A)

Hydrolysate tryptique de caséine	2,5g
Extrait de viande	5g
Glucose	1g
Extrait de la levure	2,5g
Agar	15g
Eau distillé q.s.p	1000 ml
pH=7±0.2 à 37°C	

❖ Milieu MRS (de Man Rogosa et Sharpe, 1960)

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	5g
Peptone	10g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate de sodium	2g
Glucose	20g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	0.1 g
MnSO ₄	0.05 g
Agar	12g
Tween80	1ml
Eau distillée q.s.p	1000 ml
pH=6.5±0.2 à 37°C	
Autoclavage : 121°C /15min.	

Annexe

❖ Milieu M-17

Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5g
Peptone de caséine	2,5g
Peptone de viande	2,5g
Peptone de soja	5g
Peptone de soja	5g
Acide ascorbique	0,5g
' -glycérophosphate de sodium	19g
Agar	12,75g
Sulfate de magnésium	0.25g
Eau distillée q.s.p	1000ml

pH=7.1±0.2 à 37°C
Autoclavage : 121°C pendant 15min.

❖ Milieu MSE :

Tryptone.....	10g
Gelatine.....	2.5g
Extrait de levure.....	5g
Saccharose.....	100g
Glucose.....	5g
Citrate de sodium.....	75g
Azide de sodium.....	0.075g
Agar-agar.....	15g
Eau distillée qsp.....	1000ml

pH = 6.9±0.2 à 37°C
autoclavage : 110°C pendant 20 min

➤ Milieux liquides

❖ MRS -Bouillon

Peptone	10g
Extrait de viande	8g
Extrait de levure	4g
Glucose	20g
Acétate de sodium trihydraté	5,0g
Citrate d'ammonium	2,0g
Tween 80	1,0ml
Hydrogénophosphate de potassium	2,0 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,2g
Sulfate de manganèse tétrahydraté	0,05g

pH = 6.2±0.2

❖ Clark et Lubs

Peptone tryptique ou poly peptone	5-7g
Glucose	5g
Phosphate dipotassique	5g
Eau distillée q.s.p	1000ml

pH =7±0.2

➤ Conservation des souches

- On prend des colonies bien séparées d'un milieu MRS ou M17 et les verse dans 6ml de bouillon MRS avec une incubation de 72 heures.
- On met 03 ml dans un cryotube
- On fait une centrifugation 3000 tours/min pendant 10 min à 4°C
- On jette le surnageant et on garde le culot
- On ajoute au culot 1mm BHI + 500 ml de glycérol 80% puis on vortexe avant de congeler à -20°C

Résumer

Résumer :

Cette étude a été axée sur l'isolement et l'identification des bactéries lactiques à partir du l'orge origine de El Hadjaj (région dans l'Ouest d'Algérie).

Un total de dix souches lactiques a été isolé. Ces souches ont été identifiées selon des critères microbiologiques et biochimiques connus dans la caractérisation des bactéries lactiques. Il s'agit de la détermination dans un premier temps, de l'aspect microscopique et macroscopique avec recherche de la catalase. Dans un second temps, la confirmation de l'identification des souches a été effectuée en appliquant des testes clés, par exemple, la croissance en présence de 6,5% de NaCl, 1% de NaCl, 2% de NaCl, 3% de NaCl et la fermentation de quelque sucre.

La quasi-totalité des isolats sont caractérisés par la forme coccoïde et appartenant à quatre genre *lactobacillus*(20%), *Entérocooccus*(50%), *Lactococcus*(10%), *Pediococcus*(20 %).

Mots clés : Bactéries lactiques, l'orge, *lactobacillus*, *Entérocooccus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*.