



DEPARTEMENT DE SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Benharrat Souada

Et

Mehdaoui Amina

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Nutrition et pathologies

THÈME

Isolement des bactéries à caractères
probiotiques de l'eau d'olives

Soutenue publiquement le12...../.....09...../2018

DEVANT LE JURY

Président	Dr. Mokhtar. M	MCA	U. Mostaganem
Encadreur	Dr. ZIAR. H	MCA	U. Mostaganem
Examineurs	Dr. Yahla. I	MCB	U. Mostaganem

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2017 / 2018

Remerciements

Ce mémoire a été réalisé dans sa plus grande partie au sein du laboratoire des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn badis a Mostaganem dirigé par le **Pr. Ali Riazi**.

Nous avons le plaisir de remercier tous les techniciens, laborantins, biologistes, pour leur soutien technique, et pour le temps qu'ils nous ont consacré tout au long de cette période, en répondant à nos interrogations.

Tous d'abord, nous adressons une profonde reconnaissance au **Dr Ziar Hasnia**, maitre de conférences à l'université de Mostaganem pour la formation qu'elle nous a assuré. On la remercie pour ses enseignements pédagogique et scientifique, son écoute, son ouverture d'esprit et sa vision de la recherche scientifique, qui nous ont beaucoup aidés à nous construire intellectuellement.

On souhaite témoigner nos remerciements tout aussi sincères aux membres de notre jury :

Au **Dr. Mokhtar Meriem**, maitre de conférences à l'université de Mostaganem qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury.

On est honoré par la participation de **Dr. Yahla Imène**, maitre de conférences à l'université de Mostaganem en acceptant d'examiner la qualité de ce travail.

Nous remercions tous les enseignants au sien du département des sciences alimentaires qui nous ont apporté un soutien moral, des suggestions et des conseils précieux.

Merci à toutes les personnes qui ont participes de près ou de loin à l'enrichissement de la présente étude.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail de fin d'étude à :

Ma très chère maman

A mes frères que j'adore Chaabane, Mourad et sa femme

Khadija

A mes frères Habib et sa femme Amina et Djamel et sa

femme Houwariya

A mes sœurs Fatma, Saadia, Arbia, Nadia

A mes beaux-frères

Tayeb, Hadji, Massoud, Laid.

A tous les enfants de ma famille

*Les garçons Lakhdar, Islam, Nadir, Tadj dine, Afif, Abed
Illah, Mohammed*

*Les filles Wissal, Fatima zohra, Roaya, Insaf, Hadile. Rahaf,
Miad, Wassila.*

A mes collègues de la promotion NP

SOUADA

Dédicace

Avant tous c'est grâce à notre dieu je suis arrivée

A ce stade

Je dédie ce modeste travail de fin d'étude à :

Ma très chère maman

A mes frères que j'adore chaabane, Mourad et sa femme

khadidja

A mon frère habib et sa femme amina et djamel et sa femme

howariya

A mes sœurs fatma, Saadia, Arabia, Nadia

A mes beaux-frères

Tayeb, hadji, massoud, laid.

A toutes les enfants de ma famille

Les garçons lakhdar, islam, nadir, tadj dine, afif, abd illah,

mohammed, abd illah

les filles wissal, fatima zohra, roaya, insaf, hadile. rahaf,

miad, wassila.

A mes collègues de la promotion de ANP

SOUADA

Résumé

Dans la présente étude, nous avons essayé d'isoler, de purifier et d'identifier les bactéries lactiques d'origine l'eau de fermentation traditionnelle par saumure des olives. L'isolement s'est déroulé sur un échantillon des olives vertes cueillies de la région de Sidi Lakhdar et préparées par nous mêmes. Les milieux d'isolement étaient le MRS acidifié à pH 5,4, MRS à pH 6.5. L'étude des caractéristiques phénotypiques, biochimiques, physiologiques et technologiques était réalisée par : croissance à différentes températures : 15, 37 et 45°C, croissance à pH 4.5 et 9, croissance en présence de NaCl: 2,5 ; 4 et 6,5%, type fermentaire, production des exopolysaccharides, thermorésistance , résistance aux sels biliaires et la présence d'une activité antimicrobienne.

Nos résultats ont permis d'avoir 14 isolats purifiés comme étant des bactéries lactiques. L'identification initiale effectuée laisse présager leur appartenance aux genres *Enterococcus* sp et *Lactococcus* sp Tous les isolats ont démontré une bonne action antimicrobienne vis-à-vis de pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires et une bonne résistance à la bile.

Mots-clés :

Bactéries lactiques ; eau de fermentation des olives ; *Enterococcus* sp ; *Lactococcus* sp.

Abstract

In this study, we tried to isolate, purify and identify native lactic acid bacteria from the traditional brine water of fermented olives. The isolation took place on a sample of green olives picked from the region of Sidi Lakhdar and prepared by ourselves. The isolation media were acidified MRS, MRS at pH 6.5. The study of phenotypic, biochemical, physiological and technological characteristics was carried out by: growth at different temperatures: 15, 37 and 45 ° C, growth at pH 4.5 and 9, growth in the presence of NaCl: 2.5; 4 and 6.5%, fermentative route, production of exopolysaccharides, heat resistance, bile salt resistance and the presence of antimicrobial activity.

Our results resulted in 14 isolates purified as lactic acid bacteria. The initial identification carried out suggests that they belong to the genera *Enterococcus* sp (4/14) and *Lactococcus* sp (10/14). All these isolates showed a very good antimicrobial activity (0.8 to 1 cm by the most powerful strains) against pathogens responsible of foodborne illness and demonstrated good resistance to bile.

Keywords :

Lactic acid bacteria; water of fermented olives, *Enterococcus* sp, *Lactococcus* sp.

Liste des abréviations

BL : Bactéries Lactiques

DM : Dilution Mère

Gr : Grossissement

ADH : Arginine dihydrolase

BCP: Pourpre de bromocrésol

Na Cl : Chlorure de sodium

Na OH : Hydroxyde de sodium

H Cl : Acide chlorhydrique

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂O : Hydroxyde d'hydrogène

CO₂ : Dioxyde de carbone

O₂: Oxygène

O.M.S.: Organisation Mondiale de Santé

F.A.O.: Food and Agriculture Organization

COI: Conseil Oléicole International.

Listes des tableaux et des figures

LISTE DES TABLEAUX :

CHAPITRE II: GENERALITES SUR L'OLIVIER.

Tableau 1 : Composition de l'olive selon (Maillard R, 1975).....20

Tableau 2 : Les principales variétés cultivées dans le monde (COI, 2010) 25

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 3: résumé de l'observation macroscopique des souches isolées de l'eau d'olive.....45

Tableau4 : Diamètre d'inhibition (cm) exercée par nos isolats lactiques envers certaines souches pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires.....57

Tableau 5: Résultats des tests phénotypiques, biochimiques et physiologiques
Des souches lactiques isolées de l'eau d'olive.....60

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction1

PARTIE 1 : Revue bibliographiques

Chapitre 1 : les bactéries probiotiques.

I.1. Généralités	3
I.1.1. Historique et définition des probiotiques.....	3
I-2. Les microorganismes probiotiques.....	4
I.2.1. Introduction.....	4
I.2.2. Définition et caractéristiques généraux des bactéries lactiques	4
I.2.3. Classification	
1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	6
2. Les coques lactiques	7
3- Les genres Entérocoques, <i>Lactococcus</i>	7
4. Le genre <i>Streptococcus</i>	7
5. Les genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	8
6. <i>Leuconostoc</i>	8
7. <i>Bifidobacterium</i>	8
8. Les bactéries non lactiques	11
9. Les levures	11
10. Les moisissures	12
11. Applications industrielles des bactéries lactiques	13
I.3. Domaine alimentaire	13
I.3.1. Rôle sur la structure, la texture et les caractéristiques organoleptiques	13
I.3.2. Rôle dans la conservation	13
I.3.3. Domaine de santé	13
I.4. Les bactéries lactiques comme probiotiques	14
I.4.1. Applications des probiotiques	14

Table des matières

1-L'amélioration de la digestion du lactose	14
2-Réduction du taux de cholestérol sanguin	15
3-Diminution des allergies alimentaires	15
4- Réduction du risque de diarrhée	16
5- Le traitement des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI)	17
6- Le traitements gastriques	17
7- La prévention du cancer du côlon et autres cancers	18
<u>Chapitre 2 : GENERALITES SUR L'OLIVIER.</u>	
II.1. Origine et systématique	19
II.1.1. Origine géographique et expansion de la culture	19
II.1.2. Origine génétique	19
II.1.3. L'olive	20
II.2. Description botanique de l'olivier	21
II.2.1. Certaines classifications distinguent deux sous-espèces	22
II.3. Exigences pédoclimatiques de l'olivier	22
II.3.1. Exigences climatiques	22
II.3.1.1. La température.....	22
II.3.1.2. La Pluviométrie	23
II.4. Exigences pédologiques	23
II.5. Diversité de l'olivier dans le monde	23
II.6. Diversité de l'olivier en Algérie	24
II.7. Importance et utilisation	26
II.7.1. Importance économique.....	26
II.7.1.1. Dans le monde	27
II.7.1.2. En Algérie	27
II.7.2. Importance alimentaire	28
II.8. Caractéristiques morphologiques	28
II.8.1. Le système racinaire	29
II.8.2. Les organes aériens.....	29
II.9. Caractéristiques biologiques	30
II.9.2. La phase d'activité	31
II.9.1. La phase du repos hivernal	31
II.10. La récolte des olives	32

Partie expérimental

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

III. 1. Matériel végétal	34
III.2. Techniques de prélèvements, d'échantillonnage et d'identification	35
III.2.1. Préparation des dilutions décimales	35
III.2.2. Mesure de pH	35
III.3.2. Préparation des dilutions	36
III.3.2.1. Isolement des souches bactériennes	36
III.3.2.2. Purification	37
III.3.3. Conservation des souches	36
III.3.2.3. Identification des souches	37
III.3.2.3.1. Pré-identification des souches : Les caractéristiques phénotypiques des souches	37
III.3.2.3.2. Tests physiologiques et biochimiques	39
1. Tests physiologiques	39
A/ Test de Croissance à différentes températures (15 et 37°C)	39
B/ Test de croissance en présence de NaCl (2,5 ; 4 et 6,5%)	39
C/ Test de croissance à un milieu hyperalcalin	39
2. Tests biochimiques	40
a/ Test de production de CO ₂ à partir du glucose (Holzappel and Gerber, 1983 ; Müller, 1990)	40
b/ Test de production de CO ₂ à partir du citrate (Larpent-Gourgaud et al., 1997).....	40
3. Tests technologiques	40
A* Test de la mise en évidence d'arginine décarboxylase (ADH)	40
B* Production des Exopolysaccharides (Mayeux et al., 1962)	40
C* Test de la production d'acétoïne (Clark et Lubs, 1915)	41
Test de la thermorésistance (HassaineO, 2013)	41
✓ Test de croissance en présence de bleu de méthylène (Rabah N, 2010).....	41
✓ Test de la fermentation des sucres (Larpent, 1996)	41
✓ Résistance aux sels biliaires	41
✓ Test d'oxydase.....	42
✓ La recherche d'une activité antimicrobienne	42
1- Origine des souches.....	42
2- Réactivation de souches pathogènes	43
3- Méthode de diffusion en puits AWDT (méthode de Barefoot	

et Kaenhammer, 1983)43

Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION.

IV.1. Isolement et identification des bactéries lactiques44

IV.2. Préidentification des isolats.....44

 IV.2.1. Caractérisation phénotypique des souches.....44

 IV.2.1.1. Étude morphologique des caractères macroscopique.....44

a) Sur milieu solide.....44

b) Sur milieu liquide.....45

 IV.2.1.2. L'aspect microscopique.....46

 IV.2.2. Production de la catalase et de l'oxydase.....46

IV.3. Identification des souches.....47

IV.3.1. Tests physiologiques et biochimiques.....47

IV.3.1.1. Croissance dans les conditions hostiles.....47

 IV.3.1.1.1. Culture sur milieu hypersalé.....48

 IV.3.1.1.2. Croissance aux différents pH.....49

 IV.3.1.1.3. Croissance à différentes températures.....49

 IV.3.1.1.4. Thermorésistance.....49

 IV.3.1.1.5. Type fermentaire.....50

a. Test de production de CO₂ à partir du glucose.....50

 b. Test de lait de Sherman.....51

 c. Test de production de CO₂ à partir du citrate52

 d. Production d'acétoïne.....53

IV.4.2. Tests technologiques.....54

IV.4.2.1. La production de dextrane.....54

IV.4.3. Recherche de l'activité Arginine dihydrolase (ADH).....54

IV.4.4. La détermination de l'activité inhibitrice vis à vis les souches pathogènes.....56

IV.4.6. Résistance aux sels biliaires58

Discussion générale et Conclusion59

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

L'olivier est cité dans le saint Coran comme étant un arbre béni, symbole de l'homme universel et l'huile d'olive, est source de la lumière divine pour guider les hommes.

L'origine de l'olivier se perd dans la nuit des temps, son histoire se confond avec des civilisations qui ont vu le jour autour de bassin méditerranéen, et ont pendant longtemps régi les destinées de l'humanité et marqué de leur empreintes la culture occidentale **(COI, 2000)**. L'oléastre véritable aurait existé en Algérie depuis le 12ème Millénaire avant notre ère.

Les recherches modernes ont prouvé sans contestation possible ses qualités diététiques et démontré que le pourcentage de certaines maladies notamment cardio-vasculaires est nettement inférieur dans les zones où la consommation d'olives est élevée.

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes de catégorie alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la fermentation des matières premières animales et végétales. Elles occupent des niches écologiques extrêmement variées. Leur capacité à fermenter les hydrates de carbone et, à un moindre degré, de dégrader les protéines et les lipides mène à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques et les exopolysaccharides. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés **(Mozzi et al., 2010)**.

La conservation des légumes et fruits par fermentation remonte à l'antiquité et trouve son origine en orient. Ce procédé a longtemps été le principal mode de conservation dans différentes parties du monde. Appliquée essentiellement à la choucroute, aux concombres et aux olives, elle devrait également permettre de créer de nouveaux produits à partir d'autres légumes. Cette pratique est la richesse de différents pays à travers le monde en matière de nutrition. Elle est utilisée pour la biopréservation des produits car elle augmente la durée du stockage ainsi que la qualité finale du produit en utilisant la microflore naturelle ainsi que les produits antibactériens produits.

L'olive fermentée peut être stockée pour une longue durée à raison de la teneur en acide lactique. En outre de la Communauté Européenne qui est le premier consommateur mondial, les consommations les plus importantes dans le bassin méditerranéen se trouvent en Syrie, Turquie, Maroc, Algérie et Tunisie. La consommation des olives en Algérie ne cesse de croître, en effet il s'agit d'un produit possédant un attrait indiscutable vu ses

valeurs nutritives et ses caractéristiques organoleptiques très appréciées.

Dans notre travail on s'est intéressé à « l'eau de fermentation des olives ». Les olives ont été fermenté selon la méthode traditionnelle au saumure sans addition de produits chimiques afin d'isoler des bactéries probiotiques ayant déjà une bonne résistance aux milieux hostiles.

CHAPITRE I : Les Bactéries Probiotiques.

I.1. Généralités

I.1.1. Historique et définition des probiotiques

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

Au début du XX^{ème} siècle, Elie Metchnikoff, savant ukrainien naturalisé français ayant travaillé à l'Institut Pasteur et prix Nobel en 1908 pour ses travaux sur la phagocytose, a été le premier à observer l'effet positif de certaines bactéries sur l'Homme. Il avait en effet remarqué qu'un nombre important de Bulgares vivaient plus de cent ans et il émit l'hypothèse que cette longévité était certainement due à leur importante consommation de produits laitiers fermentés, ancêtres des yaourts. Metchnikoff supposa alors que « la dépendance des microbes intestinaux vis-à-vis des aliments rend possible l'adoption de mesures pour modifier la flore de nos corps et remplacer les microbes dangereux par les microbes utiles. Metchnikoff et Tissier sont donc les premiers à émettre l'idée d'administrer des microorganismes exogènes vivants afin de palier à un éventuel déséquilibre de l'écosystème intestinal. Le concept de probiotiques était né et dès 1917, le yaourt a été développé industriellement. Il était vendu exclusivement dans les pharmacies et sa consommation était alors recommandée dans les troubles digestifs.

Mais ce n'est qu'en 1954 que le terme de probiotiques sera introduit dans la littérature par Ferdinand Vergin dans un écrit intitulé « Anti-und Probiotika ». Ce terme dérivé du grec « pro bios », qui signifie littéralement « en faveur de la vie », sous-entend que la substance ainsi dénommée a un effet bénéfique sur la vie au sens large du terme, par opposition aux effets délétères des antibiotiques (signifiant littéralement « contre la vie »).

En **1965**, **Lilly et Stillwell** parlaient des probiotiques comme des « facteurs capables de stimuler la croissance d'autres microorganismes ». Par la suite, en **1974**, **Parker** proposa d'élargir la définition à des « organismes ou substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore ». En **1989**, **Fuller** décida d'inclure à la définition des probiotiques les notions de viabilité et d'effets positifs exercés, et les désigna alors

comme des « préparations microbiennes vivantes utilisées comme suppléments alimentaires et qui affectent de façon bénéfique l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale » .

Le terme “probiotique” est un mot relativement nouveau qui signifie “en faveur de la vie” et qui est actuellement utilisé pour désigner des bactéries associées à des effets bénéfiques chez l'homme et les animaux (**FAO/OMS, 2001**). Il s'agit le plus souvent de bactéries ou de levures présentes soit dans des aliments, notamment les produits laitiers fermentés, soit dans des compléments alimentaires sous forme lyophilisée.

I-2. Les microorganismes probiotiques

Les probiotiques sont des bactéries ou des levures ingérées vivantes, présentes ou non dans le microbiote intestinal résident. Ils se répartissent en trois principaux groupes. Les souches les plus utilisées sont des bactéries lactiques qui appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

I.2.1. Introduction

Les bactéries lactiques sont des coques ou des bâtonnets, Gram positif, immobiles, non sporulées, catalase négative et généralement nitrate réductase négative.

Les bactéries lactiques sont aéro-anaérobies facultatives ou micro-aerophiles. En présence d'oxygène, elles sont incapables de phosphorylation oxydatives car elles ne peuvent synthétiser les cytochromes et les enzymes à noyau hème. Elles ont des besoins complexes en facteurs de croissance, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques, des vitamines B et des acides gras. C'est la raison qui explique leur abondance dans le lait (**Larpen, 1989 ; Novel, 1993**).

I.2.2. Définition et caractéristiques généraux 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. Il existe d'autres bactéries produisant de l'acide lactique mais qui ne sont pas considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques. C'est le cas, par exemple, de *Bacillus* et *Sporolactobacillus* qui sont des bactéries Gram (+) sporulées (**Axelsson, 2004**).

Les bactéries lactiques ne possèdent ni nitrate réductase, ni catalase, ni cytochrome oxydase mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène. L'absence de catalase est caractéristique, mais certaines espèces acquièrent cette activité sur des milieux riches en hème (**Larpent et al., 1997 ; Bourgeois et al., 1996**).

Les bactéries lactiques synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides. On les distingue en deux groupes biochimiques : les homofermentaires et les hétérofermentaires. Les homofermentaires produisent deux molécules d'acide lactique (C3) par glucose (C6) consommé. Chez les hétérofermentaires, seule une molécule d'acide lactique est produite à partir du glucose. Une autre molécule en C2 est produite (en général soit de l'éthanol soit de l'acide acétique) et une molécule d'oxygène. La différence entre ces deux groupes est détectable par le dégagement de CO₂ (**Bourgeois et al., 1996**).

Douze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (**Klein et al., 1998; Guiraud et al., 2003 ; Axelsson, 2004; Limsowtin et al., 2004**).

En général, les bactéries lactiques ont des besoins complexes en facteurs de croissance. Les milieux de culture sont complexes et dits "riches". Il est donc difficile d'obtenir de bons milieux sélectifs. Seul l'abaissement du pH sera souvent utilisé comme agent de sélection. Les bactéries lactiques tolèrent en effet des pH acides (pH = 5 et parfois moins).

A ces pH, beaucoup de bactéries communes ont leur croissance inhibée. Ces propriétés sont utilisées en agroalimentaire pour transformer la matière et empêcher le développement de la plupart des bactéries d'altération ou des pathogènes. D'autres microorganismes sont également connus pour se développer à pH acide, comme de nombreuses levures et moisissures (**Nielsen et al., 2008**).

I.2.3. Classification

La taxonomie a longtemps reposé sur les critères morphologiques et biochimiques permettant de différencier les espèces et de caractériser des variants au sein d'une même espèce. Ces tests sont :

- Le type de gram, la morphologie et la disposition cellulaire.
- Les différents métabolismes glucidiques, protéiques, lipidiques, le caractère fermentaire.
- La croissance des cellules sur des milieux hostiles

- Et la synthèse d'enzymes (de protéases), de métabolites (exopolysaccharides), de bactériocines, et la résistance aux bactériophages.

1. Le genre *Lactobacillus*

En 1896, le genre *Lactobacillus* a été décrit pour la première fois par Beijerinck, et l'espèce type était *Lactobacillus delbrueckii*.

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal et de loin le plus grand et le plus diversifié de la famille des Lactobacillaceae, il comprend actuellement 158 espèces (**Zhang et Cai, 2014**).

Il est également très hétérogène, englobant les espèces avec une grande variété phénotypique, biochimiques et physiologiques. L'hétérogénéité se traduit par la gamme du pourcentage GC de l'ADN des espèces incluses dans ce genre. Cette gamme est de 32 à 55% (**Zhang et Cai, 2014**).

Nombreuses d'entre elles sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants (**Dworkin et al., 2006**). Ils sont immobiles, sporulés et catalase négative. On rencontre chez les lactobacilles une variabilité de forme (fins, incurvés, coccobacilles,...) et de longueur (fig.3).

Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, vitamines, acides gras, nucléotides, glucides et en sels minéraux. La température de croissance est comprise entre 2 et 53 ° C, avec un optimum entre 30 et 40 ° C (**De Vos et al., 2009**).

Le pH de croissance est compris entre 3 et 8 avec un optimum habituellement allant de 5.5 à 6.2 (**Zhang et Cai, 2014**).

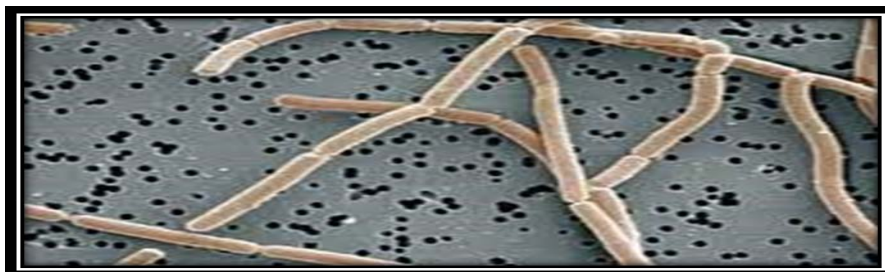


Figure 1 : *Lactobacillus acidophilus* au microscope électronique (**De Vos et al., 2009**).

2. Les coques lactiques

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

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

3- Les genres Entérocoques, *Lactococcus*

Les *Enterococcus* représentent le groupe des entérocoques, ils sont composés de streptocoques fécaux (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*) et considéré comme contaminants.

Les *Lactococcus* regroupent l'espèce *Sc. Lactis*, ses trois sous espèces *Sc. Lactis.*, *Sc. diacetylactis* et *Sc. cremoris*, *Sc. raffinolactis* et de nouvelles espèces mal classées : *Sc. plantarum* et *Sc. garviae* (Garvie et Farrow, 1982 ; Collins et al., 1983). Selon Guiraud (1998), le genre *Lactococcus* est représenté par les espèces suivantes : *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* et *Lc. diacetylactis*. La sous espèce *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* est remplacée par la sous espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

4. Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *S. salivarius*, *S. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer, 1987).

La seule espèce de streptocoque qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques (Stiles et Holzapfel, 1997).

Streptococcus thermophilus se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le

nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *S. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (**Haddie, 1986 ; Pilet et al., 2005**).

5. Les genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Ce sont des coques uniformément sphériques ou ovoïdes mais jamais allongés, dont la particularité est le regroupement en tétrade du a une division dans les deux directions perpendiculaires (**Pilet et al., 2005**).

Les espèces du genre *Pediococcus* sont mésophiles, leur métabolisme est homofermentaire, ne produisant pas de CO₂ à partir du glucose, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Poussant a un pH de 5 mais ne poussent pas à 9. Leur température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C. Ils ne sont pas en mesure de réduire le nitrate (**Holzapfel et al., 2009; Lahtinem et al., 2012; Holzapfel et al., 2006**).

Les espèces de *Tetragenococcus* ont un rôle crucial dans la fabrication des produits alimentaires à concentration élevée en sel comme les sauces de soja, alors que les *Pediococcus* sont parfois utilisés comme levains lactiques pour les charcuteries (**Guiraud et Rosec, 2004 ; Tosukhowong et al., 2005**).

6. *Leuconostoc*

Ce sont des coques groupés en paires ou en chaînes, catalase (-) (**Larpent et al., 1997**). Leur température optimale de croissance se situe entre 25 °C et 30 °C. Leur croissance est toujours lente. Le développement des *Leuconostoc* entraîne souvent l'apparition d'une viscosité dans le milieu (**Guiraud et al., 2003**). Le genre *Leuconostoc* a auparavant inclus des coccobacilles hétérofermentaires, produisant uniquement de l'acide lactique, et ne produisant pas d'ammoniaque à partir de l'arginine. Ainsi, les *Leuconostoc* sont différents des autres coques par la fermentation hétérolactique et des lactobacilles hétérofermentaires par leur morphologie. Pourtant, il est facile de confondre les *Leuconostoc* et certaines coccobacilles hétérolactiques (**Krieg et al., 2001**).

7. *Bifidobacterium*

Les bifidobactéries ont été isolées et décrites pour la première fois par Henry Tissier à la fin du XIXème siècle (**Tissier, 1900**). Cette bactérie, Gram positive, non sporulée, non productrice de gaz, non mobile, anaérobie et de morphologie bifide a été dénommée *Bacillus bifidus*. Cependant, un microbiologiste Danois, Orla-Jensen, a proposé

de classer *Bacillus bifidus* comme une espèce à part entière sous le nom de genre *Bifidobacterium* (**Orla-Jensen, 1924**). Pour lui, les bifidobactéries "constituent un genre séparé, formant probablement une connexion entre les bactéries lactiques et les bactéries propioniques". Les bifidobactéries ont été classées comme membre du genre *Lactobacillus*, en raison de leur forme en bâtonnet et de leurs caractéristiques fermentaires. Les bifidobactéries forment un genre phylogénétiquement cohérent au sein de l'embranchement des Actinobacteria (**Ventura et al., 2004**). Cet embranchement comprend également les corynebacteria, les mycobacteria et les streptomycetes (**Embley et Stackebrandt, 1994**). Les bifidobactéries représentent aujourd'hui 34 espèces, isolées principalement du TGI d'hommes ou d'animaux.

Les bifidobactéries sont souvent citées comme ayant de fortes capacités probiotiques. Cependant, l'utilisation industrielle de ces souches n'est pas aussi répandue que celles des lactobacilles. En effet, en 2009, l'analyse de 34 produits commerciaux a montré la présence de 16 bifidobactéries probiotiques contre 27 lactobacilles. De plus, parmi ces 16 bifidobactéries, 11 appartenaient à l'espèce *Bifidobacterium lactis*, connue pour ses propriétés de résistance aux stress (**Muller et al., 2009**). De même, sur les 35 souches vendues par les fabricants de ferments probiotiques, seules 11 sont des bifidocatéries.



Figure 2: *Pediococcus lactis* au microscope électronique



Figure 3 : *Lactococcus* au microscope électronique

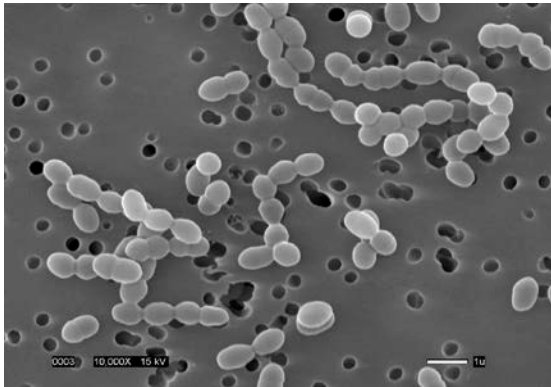


Figure4: *Leuconostoc* au microscope électronique

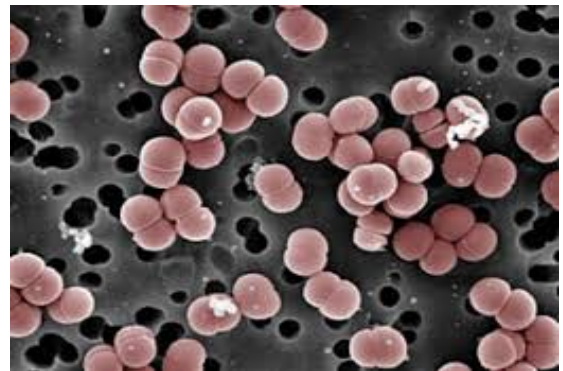


Figure5 : Entérocoques au microscope électronique

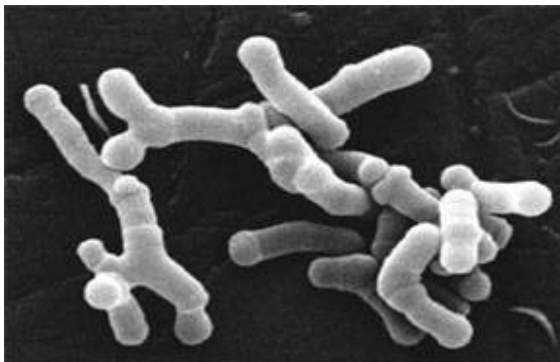


Figure6 : *Bifidobacterium bifidum* au microscope électronique

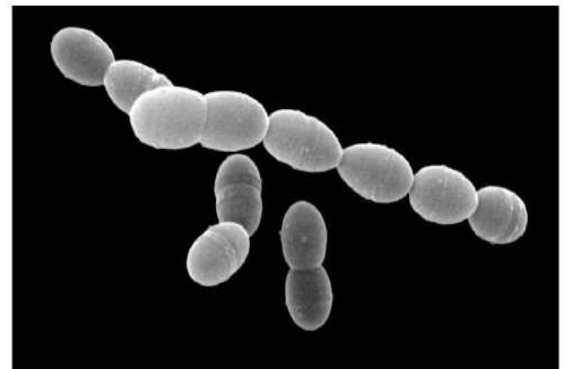


Figure 7: Morphologie cellulaire de *Streptococcus thermophilus* observée par microscopie électronique

8. Les bactéries non lactiques :

D'autres bactéries, dont le métabolisme est différent des précédentes, font également preuve d'intérêt en tant que probiotiques. Il s'agit notamment de la souche *Escherichia coli* Nissle 1917 et de bactéries sporulées dont *Bacillus subtilis* et *Bifidobacterium cereus*.



Figure 8 : *Escherichia coli* Nissle 1917.

9. Les levures

Les levures utilisées comme probiotiques sont des souches de *Saccharomyces cerevisiae*, et en particulier une souche bien déterminée dénommée *Saccharomyces boulardii* (figure 8).

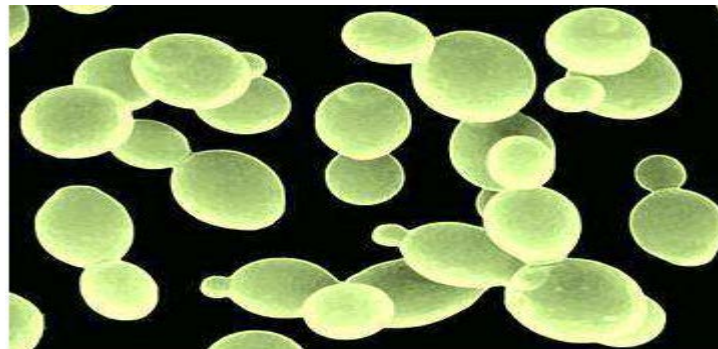


Figure 9 : *Saccharomyces boulardii* (Guiraud, 2003).

L'histoire de *Saccharomyces boulardii* est singulière à bien des égards. Elle remonte au début des années 1920 lorsque le Docteur Henri Boulard, microbiologiste de formation, se rend en Indochine, accompagné de brasseurs français qui souhaite produire de la bière sur place. Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées à l'époque comme levure de bière en France, avaient une température optimale de développement d'environ 4°C, donc totalement inadaptées au climat des tropiques. Il convenait dès lors de trouver une souche se développant à une température beaucoup plus élevée. Séjournant au Vietnam, le Docteur Boulard apprend qu'une population locale utilise une décoction d'écorces de litchis à des fins anti-diarrhéiques. L'analyse microbiologique de cette préparation a alors permis d'identifier une souche de *Saccharomyces* se développant à très haute température (37°C) pour une levure, soit celle du corps humain. De retour en France, le Docteur Boulard brevète sa découverte et lui associe son nom. Il la commercialise sous forme d'ampoules buvables sous le nom d'Ultra-levure®, comme médicament anti-diarrhéique (« ultra » parce que *Saccharomyces boulardii* à une température de croissance optimale « ultra-haute » par rapport aux souches utilisées en brasserie ou en boulangerie). Ce médicament est cédé dans les années 1950 à un industriel, François Vallet, qui s'associe à un pharmacien, depuis, diffuse le médicament dans plus de quatre-vingts pays. La maîtrise technologique du laboratoire permis, dès 1962, la lyophilisation du filtrat de *Saccharomyces boulardii*, assurant ainsi une stabilité du produit dans le temps.

10. Les moisissures

Les moisissures saprophytes (Mucorales, *Penicillium*, etc.) se développent sur les fruits crus ou cuits, les fruits séchés placés à l'humidité, les déchets de betteraves et de bagasse de canne à sucre. Elles sont utilisées depuis fort longtemps par l'homme pour la préparation d'aliments et interviennent comme agents de fermentation dans la fabrication du fromage. Elles synthétisent un grand nombre de substances complexes économiquement très importantes comme les enzymes, des acides organiques, des antibiotiques et des alcaloïdes (Moreau, 1989 ; Roquebert, 1997).

- Le genre *Aspergillus* est très répandu dans l'environnement et généralement trouvé comme contaminant banal dans les cultures surtout des céréales et dérivés telle que l'espèce *Aspergillus niger* (Derache et al., 1986 ; Davise Larone, 1987). Tandis que l'espèce *Aspergillus versicolor* a été isolée à partir des olives et des huiles végétales (Kavitha et al., 1997).

- Le genre *Rhizopus* contient plusieurs espèces. Les plus communes sont : *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus* et *Rhizopus stolonifer* isolées du sol, des graines des céréales et des matières végétales en décomposition. L'espèce *Rhizopus stoloniferus* a été isolée à partir d'huile d'olives. Les espèces de *Rhizopus* sont des moisissures qui, en se développant sur les légumes et les fruits (Bananes, Fraises) les rendent mous (**Breton, 1985**).

11. Applications industrielles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (**Streit et al., 2007**)

I.3. Domaine alimentaire

I.3.1. Rôle sur la structure, la texture et les caractéristiques organoleptiques

Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : saucissons, les laits fermentés et les fromages représentent des produits fabriqués à partir de matières premières d'origine animale, tandis que la choucroute, les olives et certains vins (fermentation malolactique) sont des exemples de transformation de matières premières d'origine végétale. Ils sont aussi utilisés en boulangerie traditionnelle. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand consommateur de ferments lactiques commerciaux, pour la production de laits fermentés, fromages, crèmes et beurres (**Daly et al., 1998 ; Hugenholtz et al., 2002 ; Axelsson, 2004 ; Streit et al., 2007**).

Selon Mäyrä-Mäkinen et Bigret (1998), la fermentation du lait par des bactéries lactiques est à l'origine de plus de mille produits différents, chacun avec ses caractéristiques spécifiques d'arôme, de texture et de qualité.

En plus de l'industrie fromagère, les lactobacilles sont utilisés dans d'autres produits laitiers. Parmi ces produits, on trouve le Kuele naoto et le Kwerioonik qui sont des produits ethniques du lait fermenté (**Vizoso Pinto et al., 2006**), le Laban zeer, le M'Bannick, le Koumiss et le Zincica (**Codex Alimentarius, 2003**).

I.3.2. Rôle dans la conservation

***production d'acide lactique** : Les bactéries lactiques ont un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques.

***production de bactériocines** : Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactique, elles sont généralement thermorésistantes.

I.3.3. Domaine de santé

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du XXème siècle, en 1907 par le Russe Metchnikoff, selon lui les *Lactobacillus* sp pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant sa flore. Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques (**Langella et al., 2001 ; Calvez et al., 2009**).

I.4. Les bactéries lactiques comme probiotiques

I.4.1. Applications des probiotiques

Grâce à leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques utilisées par les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, les probiotiques sont parfois utilisés comme compléments dans des produits comme les yaourts ou bien dans des préparations pharmaceutiques sous forme de gélules. De nombreuses souches bactériennes ont montré leurs bénéfices sur la santé humaine et sont déjà commercialisées par des firmes telles que Danone avec *Bifidobacterium lactis* (**Izquierdo Alegre, 2009**).

1-L'amélioration de la digestion du lactose

L'un des effets des bactéries lactiques (BL) qui a été le plus mis en avant et démontré chez L'homme est celui qui concerne l'amélioration de l'intolérance au lactose. Ce disaccharide, présent exclusivement dans le lait et ses dérivés, est formé de glucose et de galactose reliés entre eux par une liaison β . Sa digestion nécessite une lactase, ou β -galactosidase, qui hydrolyse cette liaison et permet alors l'absorption des sucres simples libérés. Chez les personnes souffrant d'intolérance au lactose, un déclin de la production de cette enzyme est observé au-delà de la petite enfance. La deuxième cause d'intolérance (intolérance secondaire) est représentée par les maladies dont la conséquence est une réduction de la surface de digestion-absorption intestinale ou une accélération du transit jéjunal, comme les résections intestinales, les gastro-entérites, la maladie céliaque ou les gastrectomies.

Plusieurs études ont montré que la β -galactosidase des BL participait à la digestion du lactose dans l'intestin. En principe, le remplacement du lait par du yaourt conduit à une meilleure absorption et une meilleure tolérance chez les sujets présentant une intolérance au lactose (primaire et secondaire). Il a été démontré que les bactéries qui survivaient dans l'intestin gardaient une activité métabolique suffisante pour hydrolyser le lactose et que celles dont la membrane est facilement lysée par les acides biliaires libéraient leur lactase dans l'intestin (**Izquierdo Alegre, 2009**).

2-Réduction du taux de cholestérol sanguin

Des tests *in vitro* ont montré une réduction du taux de cholestérol dans un milieu de culture avec certains *Lactobacillus*. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce fait, comme l'assimilation du cholestérol par les bactéries ou l'hydrolyse des sels biliaires conjugués (**Izquierdo Alegre, 2009 ; Ziar et al., 2014**).

Les acides biliaires, synthétisés par le foie à partir du cholestérol, sont "recyclés" et utilisés en moyenne trois fois pendant un même repas. L'hydrolyse des sels biliaires conjugués (les acides biliaires doivent être conjugués à la taurine et à la glycine pour être solubles) rend nécessaire la synthèse de sels biliaires supplémentaires, ce qui conduirait à une réduction du cholestérol. Bien que la déconjugaison des sels biliaires puisse avoir des effets bénéfiques sur l'hôte, comme la diminution des niveaux de cholestérol, une déconjugaison excessive ou une déshydroxylation des acides biliaires par certains microorganismes semble avoir plusieurs effets néfastes sur l'hôte. En effet, il a été suggéré que les sels biliaires secondaires qui en découlent (acide désoxycholique et lithocholique) endommagent l'ADN, augmentent les risques de cancer du côlon et de calculs biliaires et peuvent causer des altérations de muqueuses digestives provoquant de l'inflammation et de la diarrhée. Les bactéries les plus fréquemment désignée comme probiotiques, telles que les souches des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, sont incapables de déshydroxyler les sels biliaires déconjugés (**Izquierdo Alegre, 2009**).

3-Diminution des allergies alimentaires

L'incidence au cours des dernières décennies des maladies allergiques est en constante augmentation dans les pays industrialisés, pouvant toucher plus de 20 % de la population (**Granette, 2011 ; Waligora et al, 2011**).

Cette théorie est à l'origine de l'utilisation des probiotiques, modulateurs du microbiote, dans la prévention et le traitement de l'allergie, stratégie qui suscite beaucoup d'intérêt (**Waligora et al., 2011**).

La réaction allergique inflammatoire intervient dans un certain nombre de pathologies telles que la rhinite allergique, la dermatite atopique, les allergies alimentaires et l'asthme. Ces réactions allergiques sont dues à des réponses immunes exagérées, initiées par le contact avec des molécules allergènes. Elles sont caractérisées par une production accrue d'immunoglobulines IgE spécifiques de ces allergènes, associée au développement d'une réaction inflammatoire.

L'allergie alimentaire du nourrisson se traduit souvent par de l'eczéma atopique. Les traitements curatif et préventif de cette pathologie par des BL ont été évalués lors d'une étude clinique sur 27 enfants nourris au sein et souffrant d'eczéma atopique par **Isolauri et al. (2000)**. Il a été notamment observé qu'après deux mois de traitement avec une formule supplémentée en *L. rhamnosus* GG et *B. lactis* Bbl2, il y a eu une amélioration plus rapide de l'état atopique en comparaison avec le groupe placebo. Un effet préventif de *L. rhamnosus* GG a aussi été observé chez des enfants à risque nés de parents atopiques (**Izquierdo Alegre, 2009**).

4- Réduction du risque de diarrhée

Plusieurs types de diarrhées sont dus à des infections microbiennes. Des effets protecteurs de souches probiotiques contre certaines infections intestinales ont été observés sur des animaux. Les mécanismes potentiellement impliqués incluent la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène, d'autres substances antimicrobiennes telles que les bactériocines, la compétition pour des nutriments ou des récepteurs d'adhésion, des actions anti-toxines et la stimulation du système immunitaire. Plusieurs études randomisées contrôlées sur l'homme ont montré l'efficacité des souches probiotiques pour prévenir ou atténuer les perturbations digestives liées à la prise d'antibiotiques et les diarrhées nosocomiales infantiles dues surtout à des rotavirus. Cependant, ces effets ne sont pas universels et les probiotiques ne semblent pas efficaces en toutes circonstances (**Izquierdo Alegre, 2009**).

Les souches probiotiques *L. acidophilus* et *L. casei*, qu'on retrouve entre autre dans le lait fermenté, ont fait l'objet d'études montrant leur efficacité contre la diarrhée associée à la prise d'antibiotiques en milieu hospitalier (**Penner et al., 2005**).

L'une des affections les plus fréquentes, la diarrhée du voyageur, est une situation clinique le plus souvent due à un mécanisme infectieux. De nombreux produits pharmaceutiques destinés à prévenir cette pathologie existent sur le marché. Cependant, les études randomisées et contrôlées ayant été menées n'ont pas permis de démontrer un effet indiscutable d'un probiotique sur la diarrhée du voyageur, soit du fait d'une méthodologie statistique critiquable, soit du fait d'un trop grand nombre de sujets ayant abandonné l'étude (**Izquierdo Alegre, 2009**).

5- Le traitement des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI)

Les MICI représentent un problème majeur de santé publique, affectant environ 2,2 millions de personnes en Europe. Elles regroupent deux grandes pathologies, la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RC) (**Grangette, 2011**).

L'étiologie de ces maladies reste mal connue, cependant elle semble liée à une perte de tolérance vis-à-vis de la flore endogène chez des sujets génétiquement prédisposés.

De récentes études métagénomiques indiquent clairement que le microbiote des patients atteints de MICI est instable et que la complexité des différents phyla bactériens est réduite, indiquant de sérieuses dysbioses. Des études ont reporté des niveaux plus faibles de lactobacilles et de bifidobactéries. De ce fait, l'utilisation de probiotiques a émergé comme un outil thérapeutique intéressant pour le traitement des patients, représentant une alternative intéressante à l'utilisation de drogues immunosuppressives/anti-inflammatoires qui présentent de nombreux effets secondaires (**Grangette, 2011**).

6- Le traitements gastriques

En médecine classique le traitement, une trithérapie de sept jours associant un inhibiteur de la pompe à protons à deux antibiotiques, permet de s'en débarrasser dans 70 % des cas. Pour les malades résistants, un second traitement, quadrithérapie, plus puissant et plus long, fait disparaître la bactérie dans 63 % des cas, soit au total, un taux d'éradication de 90 %. L'inflammation persiste pendant 6 à 24 mois et la muqueuse redevient normale. Si celle-ci était déjà atteinte, les lésions persistent, mais leur extension et leur aggravation sont définitivement stoppées.

Une étude pilote effectuée par Saggiaro et al en 2005 sur 30 adultes infectés par *H. pylori* traités avec l'oméprazole + Placebo ou oméprazole + *L. reuteri* pendant 30 jours, a montré que 60% des patients ont été éradiquée, tandis qu'aucun dans le groupe placebo. **Lionetti et ses collègues en 2006** ont montré une réduction des symptômes gastro-

intestinaux par *L. reuteri* supplémentation pendant et après la thérapie d'éradication dans un groupe d'enfants infectés. Enfin, **Francavilla** et ses collègues en **2008** dans une étude pilote récente menée sur 40 adultes *H. pylori* positifs, subissant le traitement d'éradication standard, ont montré que la pré-administration de *L. reuteri* dans les quatre semaines avant le traitement réduit significativement la charge bactérienne, et diminue les symptômes gastro-intestinaux associés.

D'excellents résultats sont également signalés par l'administration de lait fermenté enrichi avec des probiotiques (**Tong et al., 2007 ; Sachdeva et Nagpal, 2009**).

7- La prévention du cancer du côlon et autres cancers

La flore intestinale et le système immunitaire jouent un rôle dans la cancérogénèse colique, ces deux paramètres pouvant être eux-mêmes modulés par des probiotiques. Plusieurs études ont montré que certains probiotiques pouvaient diminuer l'activité d'enzymes, la concentration de mutagènes ou d'acides biliaires secondaires dans les selles, qui pourraient être impliqués dans la cancérogénèse colique. Les probiotiques pourraient empêcher la croissance d'autres souches qui transforment les procancérogènes en cancérogènes, réduisant ainsi la quantité de cancérogènes dans l'intestin (**Moroni, 2007 ; Izquierdo Alegre, 2009**).

Des études épidémiologiques ont montré une relation inverse entre la consommation de produits laitiers fermentés contenant des lactobacilles ou des bifidobactéries et l'incidence des cancers du côlon et du poumon. Des études sur l'animal ont montré que la supplémentation de l'alimentation avec des souches spécifiques pouvait prévenir l'établissement, la croissance et la métastase des tumeurs induites chimiquement. Deux études randomisées et contrôlées au Japon ont montré que l'administration orale de *L. casei* souche *biolactis* diminuait de manière significative le risque de récurrence de tumeurs superficielles de la vessie chez l'homme.

D'un autre côté, bien qu'il n'y ait pas de preuves expérimentales directes de la suppression des cancers par la consommation de cultures probiotiques : il existe de nombreuses preuves indirectes basées sur des études de laboratoire, ce qui ouvre des perspectives pour l'application des probiotiques dans la prévention de certains types de cancer et encouragent la recherche dans ce domaine (**Izquierdo Alegre, 2009**).

CHAPITRE II : GENERALITES SUR L'OLIVIER.

II.1. Origine et systématique

II.1.1. Origine géographique et expansion de la culture

L'olivier a une origine très ancienne. Son apparition et sa culture remonterait à la préhistoire. Selon **Miner (1995)**, l'origine de l'olivier se trouve précisément dans les pays en bordure de berceau ; des civilisations qu'est la méditerranée : Syrie, Égypte, Liban, Grèce ou Rome et autres. Bien que d'autres hypothèses soient admises mais celle de Decandolle est la plus fréquemment retenue; qui désigne que la Syrie et l'Iran comme lieux d'origine de l'olivier (**Loussert et Brousse, 1978**), et l'expansion de sa culture est faite de l'Est vers l'Ouest de la méditerranée grâce aux Grecs et aux Romains lors de leur colonisation du bassin méditerranéen (**Loussert et Brousse, 1978 ; Breton et al., 2006 ; Artaud, 2008**).

D'après **Coi (1998)**, l'olivier a poursuivi son expansion au-delà de la Méditerranée avec la découverte de l'Amérique en 1492. Au cours de périodes plus récentes, l'olivier se trouve dans l'Afrique du Sud, l'Australie, le Japon ou la Chine.

En Algérie, la culture de l'olivier remonte à la plus haute antiquité. Nos paysans s'y consacraient avec art durant plusieurs siècles (**Alloum, 1974**). L'olivier et ses produits constituaient alors l'une des bases essentielles des activités économiques de nos populations rurales. L'huile d'olive faisait l'objet d'un commerce intense entre l'Algérie et Rome, durant l'époque romaine. Depuis cette époque, l'histoire de l'olivier se confond avec l'histoire de l'Algérie et les différentes invasions ont eu un impact certain sur la répartition géographique de l'olivier dont nous avons hérité à l'indépendance du pays (**Mendil et Sebai, 2006**).

II.1.2. Origine génétique

L'origine génétique de l'olivier est jusqu'à présent imprécise, l'oléastre a toujours été considéré comme l'ancêtre de l'olivier (**Breton et al., 2006**).

Une étude, par les marqueurs moléculaires, de la diversité génétique de l'olivier cultivé et des formes sauvages apparentées effectuée par **Guillaume (1999)** montre que la sélection des variétés que l'on trouve aujourd'hui serait le résultat d'un isolement ancestral (dernière glaciation) de 3 populations d'oliviers : Afrique du Sud, Asie et Bassin Méditerranéen (**Besnard, 2009**).

Divers travaux ont suggéré que le croisement entre les formes cultivées et/ou les formes sauvages est à l'origine des cultivars que nous avons hérités (**Breton et al., 2006 ; Idrissi et Ouzzani, 2003**).

II.1.3. L'olive

L'olive fruit de l'olivier, est une drupe plus ou moins ellipsoïdale de taille variable selon la variété. Elle se compose de trois parties : le noyau (ou endocarpe), la pulpe (mésocarpe) et la cuticule (épicarpe)

La composition chimique de l'olive (**Tableau 01**) est fonction de plusieurs paramètres dont la variété, le climat et les conditions culturales.

Tableau 01 : Composition de l'olive selon (**Maillard, 1975**).

Constituants	Eau (%)	Lipides (%)	Protides (%)	Glucides (%)	Cendres (%)
Partie anatomique					
Pulpe (épicarpe + mésocarpe)	24,2	56,40	6,8	9,9	2,66
Coque du noyau	4,2	5,25	15,6	70,3	4,16
Amandons	6,2	12,26	13,8	65,6	2,16

(*) Substances de membranes

Les vitamines A, B1, B2, B3 et E sont synthétisées durant la période de maturation du fruit. L'olive renferme aussi les constituants suivants :

- Mannitol (dans les olives non mûres) ;
- Un pigment rouge : l'oléacyanine ;
- Un glucoside amer appelé oleuropéoside ou oleuropéine ;
- Acide oléanolique ;
- Du glutathion ;
- Des diastases : oléase et émulsive active sur l'oleuropéine ;
- Une cire et une résine excrétée par l'épicarpe (**Banziger, 1998**).

II.2. Description botanique de l'olivier

Selon **Henry (2003)** l'olivier appartient à :

► l'embranchement des phanérogames (fleurs, étamines et pistils et se reproduisent par graines).

► Le sous-embranchement des Angiospermes Les angiospermes se distinguent par une double fécondation, des organes reproducteurs se groupant en fleurs bisexuées et des écailles ovulifères ou carpelles entourant complètement les ovules qui, après la fécondation, se transforment en fruit.

► La classe des Dicotylédones, on note :

- Embryon caractérisé par deux cotylédons latéraux, rarement réduits à un seul ;

-Embryogenèse selon deux plans de symétrie ;

-Feuilles comportant un pétiole et un limbe à nervation réticulée ;

-Appareil végétatif: la racine principale n'avorte pas, présence d'un véritable tronc, les feuilles sont complètes ;

La sous-classe des Asteridae, qui sont gamopétales et tétra cycliques. La corolle est d'une seule pièce ; les pétales de la fleur sont soudés entre eux.

► L'ordre des Scrophulariales

L'ordre des Scrophulariales réunit des plantes à feuilles habituellement opposées, sans stipules et le plus fréquemment à limbe entier.

► La famille des Oleaceae

Les traits caractéristiques des Oleaceae sont un androcée à 2 étamines et un ovaire à 2 loges biovulées.

L'olivier appartient à la famille largement distribuée des Oleaceae qui comprend 25 genres et plus de 500 espèces. C'est une famille très distincte, surtout caractérisée par ses fleurs régulières, souvent de parfum agréable, qui a une corolle gamopétale à 4 lobes. Les Oléacées ont des feuilles opposées ou carpelles alternes. La formule florale est la suivante : $4S + 4P + 2E + 2C$.

► Le genre *Olea*

Il regroupe 30 à 40 espèces suivant les auteurs **Gaussen (1982)** et **Cronquist (1988)**.

► L'espèce *Olea europaea* Linné

Olea europaea Linné est l'unique espèce méditerranéenne représentative du genre *Olea*.

II.2.1. Certaines classifications distinguent deux sous-espèces

- L'olivier cultivé : *Olea europaea* Linné variété *saliva* : il est constitué par un grand nombre de variétés améliorées, multipliées par bouturage.
- L'olivier sauvage, encore appelé oléastre : *Olea europaea* Linné variété oléastre.

L'oléastre se différencie de l'olivier cultivé par ces caractères: c'est un arbrisseau, il possède des rameaux épineux et quadrangulaires, ses fruits sont petits et nombreux et son huile est peu abondante.

D'après **Dupont et Guignard (2012)**, **Kadereit et Bresinsky (2013)**, l'olivier appartient à :

- **Règne** : Plantae
- **Embranchement** : Embryophytes
- **Sous Embranchement** : Trachéophytes (Plantes vasculaires)
- **Super-classe**: Spermatophytes (Plantes à graines)
- **Classe** : Magnoliopsida (Angiospermes)
- **Sous-classe** : Lamiids
- **Ordre** : Lamiales
- **Famille** : Oleacées (la famille de l'Olivier)
- **Genre** : *Olea*
- **Espèce**: *Olea europaea*L.

II.3. Exigences pédoclimatiques de l'olivier

II.3.1. Exigences climatiques

II.3.1.1. La température

L'olivier est un arbre des pays à climat méditerranéen où les températures varient entre 16 et 22°C (moyenne annuelle des températures). Il aime la lumière et la chaleur, supporte très bien les fortes températures, même en atmosphère sèche, et ne craint pas les insolation. De même il craint le froid, les températures négatives peuvent être dangereuses particulièrement si elles se produisent au moment de la floraison

(Hannachi et al., 2007). Il est aussi apte à bien supporter les températures élevées de l'été si son alimentation hydrique est satisfaisante (enracinement profond nécessaires en climat présaharien).

II.3.1.2. La Pluviométrie

Les précipitations hivernales permettent au sol d'emmagasiner des réserves en eau.

Les pluies automnales de Septembre – Octobre favorisent le grossissement et la maturation des fruits.

La pluviométrie ne doit pas être inférieure à 220 mm par an, ce nombre peu élevé montre que l'olivier supporte bien la sécheresse. Il se contente, en effet, d'une pluviométrie basse, la moins élevée de toutes les espèces fruitières.

La période de 15 Juillet au 30 Septembre est très importante pour le développement des fruits. Si elle est trop sèche, les fruits tombent prématurément et le rendement diminue considérablement. C'est pourquoi, une irrigation est parfois nécessaire pour éviter cet accident.

II.4. Exigences pédologiques

L'olivier ne présente pas d'exigences particulière sur la qualité des sols, il a la réputation de se contenter de sols pauvres, qu'ils soient argileux ou au contraire légers ou pierreux, mais ils doivent être assez profonds pour permettre aux racines de nourrir l'arbre en explorant un volume suffisant de terre.

L'olivier redoute les terrains trop humides. Le sol doit avoir une teneur en azote élevée **(Hannachi et al., 2007).**

II.5. Diversité de l'olivier dans le monde

La culture de l'olivier depuis son installation sur le pourtour méditerranéen sous ses formes sylvestres et cultivées, a été l'objet de sélections naturelle et humaine. Comme pour toutes espèces fruitières dont la culture est très ancienne l'olivier présente un nombre considérable de variétés. Cette espèce présente un grand polymorphisme dû aux influences du sol et du microclimat qui sont susceptible d'apporter des modifications qui peuvent être phénotypique et/ ou génotypique **(Ouzzani et al., 1995 ; Trujillo et al., 1995; Belaj et al., 2001).** Cette richesse du matériel génétique est notamment due à la grande longévité de l'arbre, à son histoire séculaire et à la nature de sa pollinisation **(Cantinial, 2008 ; Bracci al., 2009).**

L'olivier à développer une plate-forme variétale caractéristique pour chaque aire de culture, près de 1250 variétés cultivées dans 54 pays sont conservées dans près de 100 collections, et qui ont été incluses dans la base de données du germoplasme de l'olivier de la FAO (**Bartolini, 2008**). Ce nombre est certainement plus élevé à cause du manque d'informations pour beaucoup de cultivars locaux et écotypes (**Cantini et al., 1999 ; Muzzalupo et al., 2014**). La plus grande partie de ces cultivars vient des pays de l'Europe méridionale tels que l'Italie avec 610 cultivars, l'Espagne 280 cultivars, la France 100 cultivars, la Grèce 101 cultivars et la Tunisie 70 cultivars (**Corrado et al., 2010 ; Linos et al., 2014**). Les principales variétés cultivées dans le monde sont portées dans **le tableau 02**.

Les variétés d'olivier se divisent en trois catégories

- Les variétés à huile sont principalement destinées à l'extraction de l'huile et sont caractérisées par un rendement variable mais normalement non inférieur à 16- 18 %.
- Les variétés de table sont les variétés dont les fruits sont destinés à la consommation directe.
- Les variétés à double aptitude sont celles qui peuvent être utilisées tant pour l'extraction de l'huile que pour la production d'olives de table.

II.6. Diversité de l'olivier en Algérie

L'olivier est principalement cultivé sur les zones côtières du pays à une distance de 8 à 100 km de la mer où il trouve les conditions favorables pour son développement. Il occupait, en 2009, une superficie de 310 000 hectares (**Khoumeri, 2009**), qui se répartie sur tout le territoire comme le montre la **figure 09**.

Tableau 02 : Les principales variétés cultivées dans le monde (Coi, 2010).

Pays	Principales variétés
Albanie	Kaliniot
Algérie	Chemlal ; Sigoise ; Azeradj ; Limli ; Blanquette de Guelma
Argentine	Arauco
Chili	Azapa
Croatie	Lastovka ; Levantinka ; Oblica.
Chypre	Ladoelia
Egypte	AggeziShami ; Hamed ; Toffah
Espagne	Alfafara ; Aloreña ; Arbequina ; Bical ; Blanqueta ; Callosina ; Carasqueno de la Sierra ; Castellana ; Changlot Real ; Cornicabra ; Empiltre ; Farga ; Gordal de Granada ; Gordal Sevillana ; Hojiblanca ; Lechin de Granada ; Lechin de Sevilla ; Loaime ; Lucio ; Manzanilla cacereña ; Manzanilla Prieta ; Manzanilla de Sevilla ; Mollar de Ceiza ; Morisca ; Morona ; Morrut ; Palomar ; Picual ; Picudo ; Rapasayo ; Royal de Gazorla ; Sevillena ; Verdial de Badajoz ; Verdial de Huevar ; Verdial de Velez-Málaga ; Verdiell ; Villalonga.
France	Aglandau ; Bouteillan ; Grossane ; Lucques ; Picholine Languedoc ; Salonenque ; Tanche.
USA	Mission
Grèce	Adramitini;Amigadalolia ; Chalkidiki ; Kalamone ; Conservolia ; Koroneiki ; Mastoidis ; Megaritiki ; Valanlia.
Italie	AscolanaTenera ; Biancolilla ; Bosana ; Canino ; Carolea ; Casaliva ; Cassanese ; Cellina di Nardo ; Coratina ; Cucco ; Dolce Agogia ; Dritta ; Frantoio ; Giarrappa ; Grignan ; Itrana ; Leccino ; Majatica di Ferrandina ; Maraiolo ; NocellaradelBelice ; NocellaraEtna ; OliarolaBarese ; Oliva di Cerignola ; Ottobratica ; Pendolino ; Oisciottana ; Pizz'eCarroga ; Rosciola ; Sant Agostino ; Santa Caterina ; Taggiasca.
Jordanie	Rasi'i
Liban	Soury
Maroc	Haouzia ; Menara ; Meslala ; Picholine Marocaine
Palestine	NabaliBaladi
Portugal	NabaliBaladi
Slovénie	Bianchera
Syrie	Abou-Satl ; Doeblé ; Kaissy ; Sorani ; Zaity
Tunisie	Chemlali de Sfax ; Chétoui ; Gerbouï ; Meski ; Oueslati
Turquie	Ayvalik ; çekiste ; çebebi ; Domat ; Erkence ; Gemlik ; Izmir Sofralik Memecik ; Uslu.
Yougoslavie	Zutica.

Les principaux est les plus anciens vergers oléicoles se trouvent dans les régions montagnardes et les collines recouvrant une surface de 195 000 hectares (Khoumeri, 2009), ainsi que dans les plaines occidentales du pays (Mascara, Sig, Relizane..) et dans les vallées comme la Soummam. Cette superficie a bien nettement augmenté par la mise en place d'un programme national pour le développement de l'oléiculture intensive dans les zones steppiques, présahariennes et sahariennes (Msila, Biskra, Ghardaïa...). La carte si dessous (**figure 09**) montre la nouvelle distribution oléicole, il est net expansion des superficies vers les zones steppiques, présahariennes et même sahariennes.



Figure 10 : Carte oléicole de l'Algérie (ITAFV, 2008).

II.7. Importance et utilisation

II.7.1. Importance économique

L'olivier, signe d'identité du Bassin Méditerranéen, a constitué depuis toujours un des piliers de l'économie agricole des pays de cette région. Par les deux principaux produits dérivant de sa culture, le fruit et son huile, l'olivier joue un rôle moteur en termes d'économie, d'emploi, et d'équilibre social et environnemental des régions méditerranéennes (Marrakchi, 1988).

II.7.1.1. Dans le monde

L'olivier a connu une extension progressive à travers le monde. Actuellement la culture de l'olivier s'étale sur une superficie de 9.984.919 hectares (**FAO STAT, 2013**) dont 98% se sont situés dans le pourtour de la méditerranée (**Guerbaa, 1988 ; FAO, 2003 ; Mendil, 2009**). Selon (**Sbitri, 2009**), en 2006 et au sein du bassin méditerranéen, l'Europe concentrait 53 % des surfaces cultivées, suivie de l'Afrique (27%) et du Moyen-Orient (17 %).

Les productions mondiales d'huile d'olive et d'olives de table ont atteint un pic historique de 3.036.487 t et 20.545.421 t, respectivement en 2011/2012 (**Anonyme 1**). Les pays méditerranéens, avec plus de 95% de la production d'huile d'olive et d'olives de table restent prédominants (**FAO, 2003 ; Mendil, 2009**). Pour la campagne en cours (2012/2013), les productions mondiales s'annoncent inférieures 2.903.676 t d'huile d'olive et 16.584.857 t d'olive de table (**FAOS TAT, 2013**). Cette baisse de production est due entre autre à une diminution de 1.006.600 t de la production espagnole suite à la succession d'une gelée sévère d'hiver et aux fortes chaleurs de l'été (**Anonyme 2**).

Depuis les années 90, l'huile d'olive et l'olive de table sont consommées en quantités importantes à l'intérieur ou en dehors de leurs zones de production. Les consommations mondiales d'huile d'olive et d'olive de table progressent en suivant les mêmes rythmes et tendances que ceux de production (**Doutsias 1988 ; FAO, 2003**).

Le groupe des principaux consommateurs est constitué des pays suivants : Union Européenne, U.S.A., Syrie, Turquie, Maroc, Algérie, Brésil, Japon, Australie, Canada et Tunisie. L'Union Européenne est le plus grand consommateur mondial avec une part de 66 % (**Anonyme 3**).

II.7.1.2. En Algérie

L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens dont le climat est plus favorable à la culture de l'olivier où il constitue une des principales essences fruitières à l'échelle nationale (**Benderradji et al., 2007 ; Babouche et Kellouche, 2012**). L'oléiculture algérienne est constituée d'environ 32 millions d'arbres (**Bensemmane, 2009 ; Mendil, 2009**), répartie sur une superficie d'environ 328.884 hectares (**FAO STAT, 2013**) soit 34,09% du verger arboricole national.

L'olivier, de par ses fonctions multiples de lutte contre l'érosion, de valorisation des terres agricoles et de fixation des populations dans les zones de

montagne, s'étend sur tout le territoire national. D'après (**Chaux, 2012**), il se concentre notamment dans trois principales régions : la région du Centre (54%), la région de l'Est (29%) et la région de l'Ouest (17%).

Pour la région centre, l'essentiel du verger oléicole de cette zone (95%) est occupé par les wilayas de Béjaïa, Tizi-Ouzou et Bouira. Les wilayas de Guelma, Sétif, Jijel et Skikda détiennent 68% du verger oléicole de la région Est ; et enfin, la région Ouest représente 71% du verger est occupé par les wilayas de Mascara, Sidi Bel abbés, Relizane et Tlemcen.

La filière oléicole nationale est en grande partie dominée par le secteur privé, elle constitue une source de revenus significative pour la population rurale et offre en moyenne 55 000 emplois permanents (**Benderradji et al., 2007**).

En termes de production d'olives nationale, elle connaît des variations importantes d'une année à l'autre, dues à divers facteurs tels que la productivité alternante caractéristique de certaines variétés, la pluviométrie, les incendies de forêts dans certaines régions du pays et les pratiques culturales. En 2012, la production nationale d'olive et d'huile d'olive était 393 840 t et 55 200 t (**FAO STAT, 2013**).

L'oléiculture algérienne est en grande partie à caractère familiale où l'autoconsommation est privilégiée (**Nouad, 2004 ; Benabid, 2009**), cela fait que la vente d'huile d'olive n'est pas assez développée. Les exportations algériennes d'huile d'olive, sont, contrairement aux pays voisins, à un niveau modeste, ne dépassant pas les 2500 tonnes par an. Elles sont essentiellement destinées à la France, au Canada, à la Belgique, en plus de quelques tentatives récentes vers la Chine (**Massissilia, 2012**).

II.7.2. Importance alimentaire

Arbre typiquement méditerranéen, l'olivier est cultivé notamment pour son fruit, l'olive, dont l'huile est un élément clé du régime méditerranéen. Ingrédient incontournable, l'huile d'olive est largement utilisée dans les cuisines méditerranéennes (**QAIC, 2008**). (**Selon Luaces et al., 2003 ; Benabid 2009**). La forte consommation de l'huile d'olive à travers le monde est due à ses vertus nutritionnelles et diététiques ainsi qu'à ses propriétés organoleptiques.

Toutes les études démontrent que les régimes alimentaires à base d'huile d'olive sont bénéfiques pour la santé humaine en diminuant le risque de plusieurs maladies. La consommation régulière de cette huile est associée à une incidence limitée

des maladies cardiovasculaires, des désordres neurologiques, cancers du sein et du colon, ainsi qu'aux propriétés antioxydantes (**Ghedira, 2008**). Ces bienfaits sont liés l'un ou l'autre à sa richesse en acides gras bien-équilibrée, où l'acide oléique est le composant principal et ou à la présence des biomolécules mineures, telles que les vitamines et les antioxydants naturels.

II.8. Caractéristiques morphologiques

II.8.1. Le système racinaire

L'olivier possède un système racinaire fasciculé très puissant, généralement situé sous le tronc dans une profondeur de 50 à 70 cm (**Argenson et al., 1999**). Des rejets, assureront la pérennité de l'arbre, se développent à proximité du collet où les racines offrent une surface raboteuse et bosselée appelée souchets ou ovules (**Argenson et al., 1999**).

II.8.2. Les organes aériens

La partie aérienne d'un plant d'olivier comprend : le tronc, les charpentières, la frondaison et les rameaux fructifères (**Loussert et Brousse, 1978**).

❖ Le tronc

D'après (**Pagnol, 1975**), le tronc d'un olivier est tout d'abord lisse, gris verdâtre jusqu'à la dixième année environ. Avec le vieillissement, il se déforme en devenant noueux, crevassé, fendu, élargi à la base et d'une couleur gris foncé presque noire.

Selon la zone de culture et le mode de conduite adopté, certains oliviers atteignent 8 à 10 m de hauteur, alors que d'autres ne dépassent guère 3 à 5 m.

❖ Les charpentières

Ce sont de grosses ramifications destinées à former la charpente de l'arbre. Il s'agit des charpentières mâtresses ou branches mères qui prennent naissance sur le tronc et des sous-charpentières ou sous branches mères qui se développent sur les charpentières (**Loussert et Brousse, 1978**). Ces sous-charpentières portent des rameaux feuillés et des rameaux fructifères qui formeront le port de l'arbre.

❖ La frondaison

Elle est constituée principalement par l'ensemble du feuillage (**Loussert et Brousse, 1978**). La feuille de l'olivier est simple, entière, à pétiole court et à limbe lancéolé qui se termine par un mucron (**Argenson et al., 1999**). Les feuilles sont opposées et persistantes, leur durée de vie est de l'ordre de 3 ans. Elles possèdent des formes et des dimensions très variables suivant les variétés. Elles peuvent être ovales, ovales oblongues, lancéolées et parfois presque linéaires. Les dimensions peuvent varier de 3 à 8 cm de long et de 1 à 1,25 cm de large (**Loussert et Brousse, 1978**).

❖ Les rameaux fructifères

Ce sont les rameaux qui porteront les fleurs puis les fruits (**Loussert et Brousse, 1978**). L'inflorescence est une panicule (**Chol et al., 2005**), constituée de grappes longues et flexueuses dressées à l'aisselle des feuilles de l'année précédente, elle peut comporter de 10 à 40 fleurs selon la variété (**Loussert et Brousse, 1978**). Petites et d'un blanc jaune verdâtre, Les fleurs sont régulières, hermaphrodites avec une formule florale très simple : 4 sépales, 4 pétales, 2 étamines, 2 carpelles (**Argenson et al., 1999**).

Le fruit est une drupe à mésocarpe charnu, riche en lipide, de diamètre compris entre 1 et 3 cm (**Argenson et al., 1999**). L'endocarpe ou noyau est dur, généralement fusiforme portant une série sillons longitudinaux. Il renferme une graine à albumen : l'amandon (**Loussert et Brousse, 1978**). La couleur de l'épiderme et les formes du mésocarpe et de l'endocarpe sont des caractères variétaux (**Chol et al., 2005**).

A maturation, l'épicarpe passe de la couleur vert tendre (olive verte), à la couleur violette ou rouge (olive tournante) et enfin à la couleur noirâtre (olive noire) (**Loussert et Brousse, 1978**).

II.9. Caractéristiques biologiques

Comme toutes les espèces fruitières ligneuses, l'olivier répond aux mêmes phénomènes biologiques et physiologiques de développement. Le cycle évolutif annuel d'un arbre fruitier concerne l'ensemble des processus et des changements que subit la plante durant une année (**Benettayeb, 1993**). Il se distingue par deux grandes phases : de repos et celle d'activité.

II.9.1. La phase du repos hivernal

En général, elle s'étend de la chute des feuilles en automne, à l'apparition des premiers signes d'activité au printemps (**Benettayeb, 1993**). Chez l'olivier, elle s'étale généralement de Novembre à fin Février –début Mars (**Loussert et Brousse, 1978**).

II.9.2. La phase d'activité

Deux principaux processus (la croissance végétative et la fructification) se déroulent au cours de cette période.

A) La croissance végétative

Elle se caractérise par l'apparition de nouveaux organes, jeunes pousses et nouvelles racines d'une part et, par le développement de ces organes d'autre part. La croissance végétative commence chez l'olivier au début du printemps (Mars) en donnant des nouvelles pousses feuillées et des bourgeons à l'aisselle de ces feuilles (**Benettayeb, 1993**).

B) La fructification

Fernandez-Escobar a défini la fructification comme étant l'ensemble des processus physiologiques intervenant chez une plante, se traduisant par la formation de fruits (**Fernandez, 1993**).

➤ La floraison

Elle désigne la maturité des organes sexuels suite au développement des ébauches florales et se traduit par l'épanouissement des fleurs (**Benettayeb, 1993**).

D'après (**Argenson et al., 1999**), la floraison s'effectue sur la pousse de l'année précédente et la pousse de deux ans qui n'a pas fleuri l'année 1. Chez l'olivier, les fleurs s'épanouissent d'avril à juin suivant les conditions climatiques. En général, 1 à 5% de ces fleurs suffit pour assurer la récolte (**Pesson et Louveaux, 1984**).

➤ Les stades repères et la floraison

L'évolution de la fleur de l'olivier est en étroite relation avec les conditions climatiques notamment les températures printanières (**Colbrant et Fabre, 1976 ; cités par Loussert et Brousse, 1978**).

➤ **Pollinisation et fécondation**

La pollinisation puis la fécondation des ovules interviennent pendant le mois de Mai (**Fernandez, 1993**). Assurée par le vent, la pollinisation chez l'olivier est généralement croisée (interpollinisation). L'autofécondation, par contre, est un phénomène assez rare (**Loussert et Brousse, 1978**). Pour certaines variétés présentant des cas de stérilité ou d'incompatibilité, une inter pollinisation est également nécessaire. Dans ces cas, la plantation des variétés en mélange sera indispensable pour assurer la récolte (**Pesson et Louveaux, 1984**). Le choix des pollinisateurs est en fonction de leur productivité, de la qualité de leurs grains de pollen et surtout de la concordance de leur période de floraison avec celle des cultivars à polliniser (**Ouksili, 1983 ; Mehri et Kamoun, 1995**).

➤ **Nouaison et grossissement du fruit**

Le jeune fruit en cours de formation apparaîtra hors de la cupule calicaire après la fécondation, c'est la nouaison (**Loussert et Brousse, 1978**). Cette dernière dépend des facteurs biologiques (pollinisateurs compatibles, viabilité des pollens) et climatiques (vent, Température). Si les températures printanières sont fraîches, le nombre de fruits développés peut aller jusqu'à 5 ou 7 fruits par inflorescence (**Argenson et al., 1999**). Selon (**Loussert et Brousse 1978**), une chute de fruits peut survenir plus tard en juin. Elle est utile car elle constitue un éclaircissage naturel. Les fruits subsistant continuent leur grossissement jusqu'au début de la pigmentation de la pulpe (arrêt de la croissance du fruit) (**Argenson et al., 1999**).

➤ **Maturation du fruit**

C'est la phase durant laquelle le fruit s'enrichit en huile (**Loussert et Brousse, 1978**). Elle commence vers la mi-octobre, quand le fruit commence à changer de couleur (véraison) et se poursuit jusqu'à la mi-novembre ou janvier selon les cultivars et les conditions climatiques locales. Deux phases de maturation sont considérées ; la maturation verte et la maturation noire (**Argenson et al., 1999**).

II.10. La récolte des olives

Il existe de nombreuses techniques de récolte des olives variant en fonction de la destination finale de ces olives, de la nature du sol et de la superficie de l'exploitation. La méthode traditionnelle est la récolte à la main ; c'est la plus respectueuse de l'arbre mais la récolte est fastidieuse et très longue donc cette technique n'est plus utilisée que pour les olives de table (car elles ne doivent pas être abimées) (**Veillet, 2010**).

La méthode la plus communément utilisée en Algérie est la cueillette au peigne manuel (**Figure 10**) : les oléiculteurs déposent un filet sur le sol et utilisent un peigne qui va arracher les olives de la branche et les faire tomber sur le filet.

Il existe maintenant des systèmes de peignes mécaniques équipés d'un moteur faisant tourner les peignes au bout d'un manche télescopique. Cette technique permet une récolte plus rapide des olives et reste peu traumatisante pour les oliviers. En Espagne ou en Italie la technique la plus utilisée sur les grandes exploitations est celle par vibration des branches : des pinces métalliques viennent enserrer le tronc de l'olivier et une vibration à haute fréquence va être appliquée au tronc. Les olives mûres vont alors tomber de l'arbre et peuvent être utilisées pour la production d'huile. Le principal inconvénient de ce système, outre son coût à l'achat, est les dégâts qu'il peut occasionner aux jeunes rameaux des oliviers (**Veillet, 2010**).



Figure 11 : La cueillette des olives par les différentes méthodes (**Henry, 2003**).

A : à la main ; B : au peigne manuel ; C : au peigne mécanique ; D : vibration des branches

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

L'ensemble de ce travail a été réalisé au laboratoire des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS, site III, ex. INES de chimie) et au laboratoire de Microbiologie 2 (Micro-2 au site II, ex, ITA), faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie de l'université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.

III. 1. Matériel végétal

Cette étude a porté sur les olives cueillis d'un seul olivier planté à une maison à Sidi Lakhdar, willaya de Mostaganem.

Nous avons cueillies (mois de Novembre 2017) correctement, environ 2,5 kg d'olives vertes et nous les avons mises dans un plat ovale d'argile à la température ambiante. L'eau a été renouvelée tous les jours pendant 15 jours. Au fur et à mesure les olives changent de couleur : elles perdent leur couleur verte tendre pour virer un peu au vert - jaunâtre. Elles perdent aussi leur amertume. Au bout de 10 jours, une olive est goûtée. Cette opération est indispensable pour voir si elle a perdu presque toute son amertume.



Figure 12 : des échantillons de l'expérience

Au 16^{ème} jour, nous avons ajouté 75 g /2.5 litre d'eau et la fermentation est laissée pendant 15 jours sans changer l'eau.



Figure 13 : les conditions d'expérience

Au 31^{ème} jour, nous avons ajouté la même quantité de sel (75 g) dans l'eau de fermentation et les olives terminent leur fermentation de deux mois.

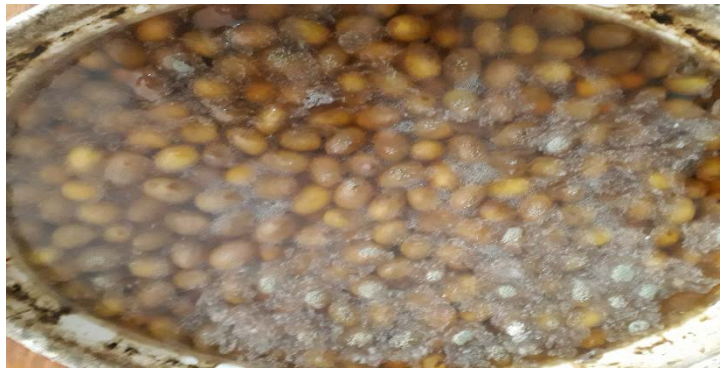


Figure 14 : La constitution d'une couche blanche reflétant une bonne fermentation microbienne des olives.

III.2. Techniques de prélèvements, d'échantillonnage et d'identification

III.2.1. Préparation des dilutions décimales

Un millilitre de la dilution mère (10^{-1}) est prélevé aseptiquement à l'aide d'une micropipette et introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. On obtient ainsi la dilution 10^{-2} et on répète la même procédure en prélevant 1ml à partir de la dilution 10^{-2} et en l'introduisant aseptiquement dans un tube à essai contenant 9 ml du diluant et ainsi de suite jusqu'à 10^{-7} (Guiraud, 2003).

III.2.2. Mesure de pH

Le pH des différents échantillons d'olive est mesuré par un pH-mètre, la mesure du pH exprime la concentration en H^+ . Après l'étalonnage du pH-mètre, l'électrode est placée

directement dans la masse l'échantillon (eau de fermentation des olives) (**Saoudi, 2012**).

III.3.2. Préparation des dilutions

III.3.2.1. Isolement des souches bactériennes

- 1 mL de la solution mère (eau d'olives) dans une solution peptone sel. Cent microlitres (0,1ml) des dilutions (10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7}) sont ensemencés en surface sur les milieux M17 gélosé, MSE gélosé et MRS gélosé (pH 5.4 et 6.5).
- Incubation :

M17 : deux série de boites : (1) cocci mésophiles incubation à 30°C en aérobiose 24 à 48h ; (2) cocci thermophiles incubation à 45°C en aérobiose 24 à 48h.

MSE : incubation à 30°C en aérobiose 24h à 5 jours.

MRS : (pH 5.4 : 6.5) : deux série de boites : (1) lactobacilles mésophiles incubation à 30°C en anaérobiose enrichie en CO₂ (jarre +bougie) 24 à 72h ; (2) lactobacilles thermophiles incubation à 45°C en anaérobiose enrichie en CO₂ (jarre +bougie) 24 à 72h.

Anaérobiose : mélange de bicarbonate de Na et FeCl₃+ bougie.

III.3.2.2. Purification

La purification des souches isolées est réalisée par repiquages successifs alternant sur milieux sélectifs MRS liquide et solide (par la méthode des stries), et l'incubation à 37°C.

La pureté des souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur (couleur, taille et forme) (**Guiraud, 2004**). Ces colonies pures sont retenues pour la suite de l'étude

III.3.3. Conservation des souches

Deux types de conservation ont été appliqués. Une à courte et l'autre à longue durée.

-Conservation courte durée

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur milieu solide MRS incliné. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines (**Badis et al., 2005**).

-Conservation longue durée

Pour une conservation à long terme, à partir des cultures de 18h (milieu liquide), Le milieu de conservation contient 70% d'une solution de suspension bactérien et de glycérol à 30%.

Les cultures sont conservées en tubes Eppendorfs à -20°C . Avant toutes utilisations des souches, une culture congelée était réactivée et repiquée sur son milieu pendant deux nuits successives (**Bolduc et al., 2006**).

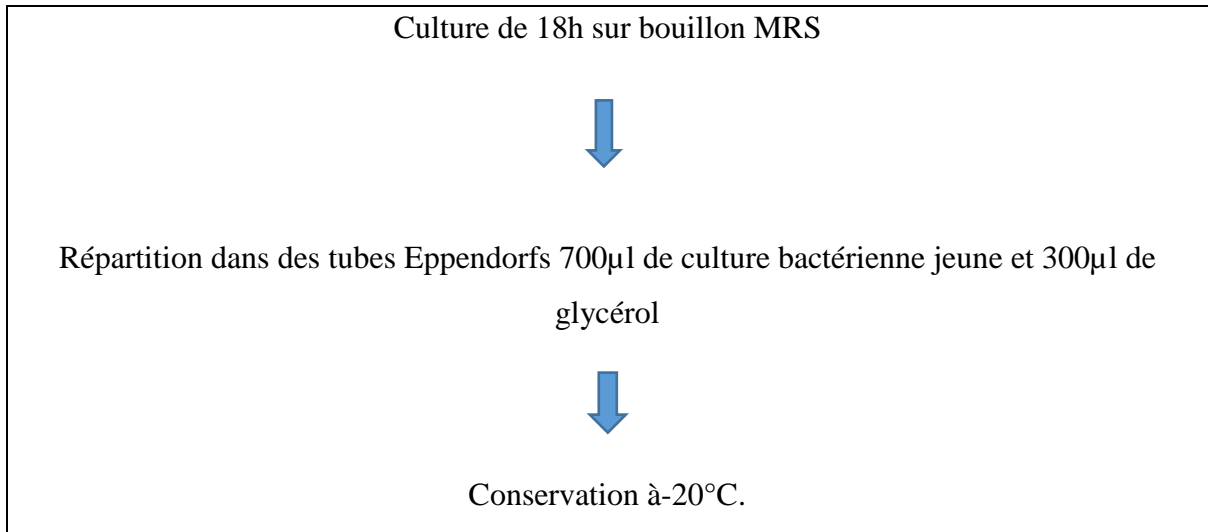


Figure 15: Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques (**Saidi et al., 2002**).

III.3.2.3. Identification des souches

Après l'étude macroscopique des colonies, on prend de chaque boîte 10 colonies isolées de forme caractéristique sur lesquelles sera effectuée une coloration de Gram et une recherche de la catalase.

III.3.2.3.1. Pré-identification des souches : Les caractéristiques phénotypiques des souches

- Étude morphologique

A/ L'aspect macroscopique et microscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu MRS solide et liquide ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies sur milieu MRS solide (**Badis et al., 2005**) et le trouble dans le milieu liquide.

L'étude macroscopique nous a permis de noter le diamètre, la pigmentation et l'aspect des colonies (**Hassaine, 2013**).

B/L'aspect microscopique

L'étude microscopique par l'intermédiaire de la coloration de Gram, nous a permis d'examiner la forme, le mode d'association et le Gram de ces bactéries.

La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par (**Prescott et al., 2003**). Cette coloration permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement (**Hadef, 2012**).

C/Coloration de Gram

❖ Principe

La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. Elle doit être parfaitement maîtrisée car c'est le point de départ du choix des examens complémentaires à effectuer, des milieux àensemencer.

❖ Technique

- Réaliser un frottis ou un étalement.

- Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50 - 60°C (brièvement supportable à la main) ce qui les sèche, puis laisser refroidir la lame.

- Immerger (ou inonder) les lames dans la solution de Cristal Violet pendant 1mm.

- Lavage à l'eau en transvasant les lames.

- Immerger (ou inonder) les lames dans du Lugol pendant 1 mn en les agitant.

- Laver à nouveau à l'eau distillée.

- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.

- Laver à l'eau distillée.

- Contre colorer avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant 20 à 30 secondes.

- Laver à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant vers 50°C. Les lames doivent être parfaitement sèches.

D/Test de catalase

- Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame.
- Y déposer, à l'aide de l'anse de platine ou d'une pipette Pasteur boulée, une colonie isolée (ou plusieurs si petites colonies) de la souche à tester.
- Observer l'apparition de bulles.
 - Dégagement gazeux, cad ; Production d'O₂ provenant de la dégradation d'H₂O₂ : Souche catalase +
 - Absence de dégagement gazeux, cad ; Absence de production d'O₂ provenant de la dégradation d' H₂O₂ : Souche catalase -

☞ Les bactéries aux formes bacillaires Gram-positives et catalase-négatives sont repiquées sur le bouillon MRS.

☞ Les bactéries aux formes de coque Gram-positives et catalase-négatives sont repiquées sur le milieu bouillon M17.

III.3.2.3.2. Tests physiologiques et biochimiques

1-Tests physiologiques

-Croissance dans les conditions hostiles (Sherman, 1937 ; Larpent Gourgaud et al., 1997)

A/ Test de Croissance à différentes températures (15 et 37°C)

Les souches bactériennes sont ensemencées dans leurs milieux sélectifs et tester leurs croissances à deux températures 15°C et 37°C. Le développement des souches était apprécié après une semaine d'incubation pour les cultures à 15°C et après 24 et 48 H pour les cultures à 37°C, par comparaison avec un tube de milieu non ensemencé incubé à la même température (examen de la turbidité).

B/ Test de croissance en présence de NaCl (2,5 ; 4 et 6,5%)

Sur des bouillons hypersalés contenant du NaCl à concentration de 2,5 ; 4 et 6,5% (composition voir l'annexe), cultiver les souches isolées et les faire incubées à des températures adéquates pendant 24 à 72 h. Le développement des cultures a été apprécié par comparaison avec un tube témoin non ensemencé, incubé dans les mêmes conditions.

C/Test de croissance à un milieu hyperalcalin

Le test a été réalisé sur un bouillon ajusté à un pH = 9,6 (composition voir annexe). Après ensemencement du milieu avec une culture jeune et incubé à 30°C pour les souches mésophiles et à 45°C pour les souches thermophiles pendant 24 à 72h. Après incubation, l'observation d'un trouble signifie que la bactérie résiste au milieu hyperalcalin (pH = 9,6).

2. Tests biochimiques

a/Test de production de CO₂ à partir du glucose (Holzapfel and Gerber, 1983 ; Müller, 1990)

Des colonies bien isolées ont été ensemencées sur milieu MRS bouillon modifié (sans le citrate et l'extrait de viande) renfermant une cloche de Durham inversée. L'incubation se fait à une température de 37°C pendant 24 à 48h.

b/ Test de production de CO₂ à partir du citrate (Larpen-Gourgand et al., 1997)

Dans 10,5 ml du lait écrémé stérile, additionner 0,5 ml d'une solution de citrate de Na à 10% et laisser reposer 30 min. Les tubes sont inoculés avec 0,1ml d'une suspension bactérienne de 24h. Ensuite, ajouter 4ml d'une gélose blanche (1,5%) fondue et refroidie à 50°C et mélanger sans faire de bulles. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 3 à 5 jours. La production de gaz se traduit par la fragmentation de la gélose dans le tube.

3. Tests technologiques

A* Test de la mise en évidence d'arginine décarboxylase (ADH)

Une culture de 24h est ensemencée dans le milieu Moller à l'arginine et sur un autre sans l'arginine (serviront de contrôle). Puis l'ajout d'une couche de l'huile de vaseline stérile (1ml) pour favoriser les conditions d'anaérobiose. La lecture s'effectue après 1 à 2 jours à 37°C.

L'arginine décarboxylase est mise en évidence par le changement de la couleur du milieu du violet vers le jaune au bout de quelques heures (8-10 h) qui s'explique par l'acidification du milieu par les bactéries lactiques en utilisant le glucose comme source de carbone et d'énergie, puis un virage vers le violet (après 24 h) qui est due à la formation d'ammoniaque (réalcalinisation du milieu). Le tube témoin vire au jaune et garde la couleur.

B*Production des Exopolysaccharides (Mayeux et al., 1962)

La production des exopolysaccharides (dextranes) à partir du saccharose est mise en évidence sur milieu MSE gélosé. Les souches productrices de dextranes sont caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes. Ce test est aussi considéré

comme clé d'indentification permettant aussi de différencier entre les leuconostokes productrices et non productrice de dextrans.

C*Test de la production d'acétoïne (Clark et Lubs, 1915)

Le milieu utilisé est le bouillon Clark et Lubs préalablement inoculé avec des souches bactériennes et incubé à une température adéquate pendant 24h.

L'acétoïne est mis en évidence par la réaction de Voges Proskauer (VP), en ajoutant 10 gouttes de réactif VP1 et le même volume de réactif VP2. Les tubes sont inclinés pour permettre une bonne oxygénation. La réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge à la surface du milieu, après quelques minutes à 1 heure.

✓ **Test de la thermorésistance (HassaineO,2013)**

Les souches bactériennes sont inoculées dans des tubes contenant le bouillon MRS et mises dans un bain-marie (Mettler, Germany) à 63,5°C pendant 30 minutes. Après le traitement thermique les tubes ont été transvasés dans le même milieu stérile et incubées à 30°C / 37°C pendant 24 à 48 h. Le résultat positif se traduit par un trouble confirmant une croissance bactérienne.

✓ **Test de croissance en présence de bleu de méthylène (Rabah N, 2010).**

L'aptitude des souches lactiques de forme cocci à pousser en présence de bleu de méthylène aux différentes concentrations 0,1% et 0,3% (p/v) dans le lait écrémé stérile est testée.

Ce test nous permet de différencier entre les lactocoques qui poussent en présence de 0,3% de bleu de méthylène, les entérocoques qui poussent en présence de 0,1% et non à 0,3% et les streptocoques thermophiles qui sont très sensible au colorant.

La réaction positive se traduit par la réduction de par la réduction de bleu de méthylène qui vire de bleu (forme oxydé) vers transparent (forme réduite).

✓ **Test de la fermentation des sucres (Larpen, 1996)**

Ce test est réalisé en établissant leurs profils fermentaires à l'aide de galeries biochimiques API50 CH (voir l'annexe).

Les milieux API50CHL prêts à l'emploi, associés à la galerie API50CH permettent de réaliser l'étude du profil fermentaire des souches isolées, après incubation à 37°C pendant 48h, tous les sucres fermentés virent au jaune sauf l'esculine qui vire au noir.

✓ **Résistance aux sels biliaires**

Etude de la survie des souches lactiques dans les conditions extrêmes du tube digestif. Le but de cette étude est de sélectionner des souches lactiques extrêmophiles qui peuvent résister aux barrières physiologiques du tube digestif (pH stomacal bas, péristaltisme intestinale et concurrence bactérienne au niveau du gros intestin). La méthode utilisée est celle de (Ziar et al., 2012).

La résistance des isolats bactériens aux sels biliaires a été déterminée dans des tubes à essai contenant le bouillon MRS et 0.3% de sels biliaires à pH 6.4, les tubes ont été inoculés avec une culture jeune des isolats bactériens puis incubés à 37°C pendant 24h à 48h dans des boîtes contenant le MRS. Le test est considéré positif s'il y'a croissance bactérienne.

✓ **Test d'oxydase**

Le test oxydase permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme capable d'oxyder le substrat utilisé et ne signifie pas la présence d'une oxydase particulière (Guiraud, 1998). Le substrat utilisé est l'oxalate de diméthyl-paraphénylène-diamine sous forme d'un disque du papier filtre. On prélève une colonie de la souche à étudier à l'aide d'une anse stérile et on l'étale sur le disque d'oxydase préalablement imbibé avec une goutte d'eau distillée stérile. La présence de l'oxydase se manifeste par une coloration violette après 30 secondes et la bactérie est jugée oxydase positive (Singleton, 2005).

✓ **La recherche d'une activité antimicrobienne**

1-Réactivation de souches pathogènes

L'inoculum a été réactivé la souche pathogène en transférant 10 µl de la culture conservé dans 10 ml de bouillon nutritif qui sera incubé à 37° C pendant 24h. Après incubation, la densité optique sera ajusté à 0.08-0.1 lue à 600 nm ce qui correspond à 10⁸ UFC/ml (Kishor, 2005).

2- Méthode de diffusion en puits AWDT (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983)

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongogramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu semi solide (gélose molle), l'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la

technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit testé (**Broadsky et al., 1976**)

Cette méthode consiste à couler 21 ml Muller Hinton molle avec 100µl d'une culture jeune de 18h d'incubation et dont la charge cellulaire est de l'ordre de 10^7 UFC/ml (la densité optique 0.08-0.1) sur une boîte de pétri. Après solidification à température ambiante dans une zone stérile, des puits sont creusés. Généralement ont réalisé 1 puits par boîte de 6mm de diamètre (chaque test est réalisé en triplicat). Un volume de 80µl de suspension bactérien est mis dans les puits.

Les boîtes de pétri sont incubées à 37°C pendant 24h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (pré-diffusion) (**Doumandji et al., 2010**).

La présence de zone d'inhibition formée autour des puits est examinée après 18 à 24h d'incubation (**Hwanhlem et al., 2011**)

La lecture des résultats se fait par la mesure de diamètre des zones d'inhibition apparaissant ; il sera considéré comme positif si le diamètre est supérieur à 2 mm.

Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSION.

IV.1. Isolement et identification des bactéries lactiques

La purification des souches lactiques isolées a été réalisée par plusieurs repiquages successifs sur milieu MRS agar (avec alternance sur milieux liquides). Nous avons obtenu 14 isolats purs à partir de l'eau de fermentation des olives. Les colonies sont d'un aspect (couleur et forme) typique et homogènes des bactéries lactiques, de diverses tailles (grandes, moyennes, petites) et ont été gardées pour la suite de l'étude.

IV.2. Préidentification des isolats

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

IV.2.1. Caractérisation phénotypique des souches

Ces tests sont effectués pour but de déterminer le genre des souches isolées.

IV.2.1.1. Étude morphologique des caractères macroscopique

a) Sur milieu solide

L'observation des colonies des bactéries cultivées sur milieu MRS gélose (**figure 16**) nous a montré des colonies blanchâtres, lisses de différentes tailles au contour régulier.



Figure 16 : L'aspect macroscopique de la souche pure sur milieu MRS gélosé.

Les résultats sont résumés dans le **tableau 4** ci-après:

Tableau 3 : Résumé de l'observation macroscopique des souches isolées de l'eau de fermentation des olives.

Produit	Code	Forme	Couleur	Aspect	Taille	Milieu d'isolement
Eau de fermentation des olives	M1	Régulière	Blanchâtre	Lisse	Petite	MRS gélose
	M2				Petite	
	M3				Grande	
	M4				Petite	
	M5				Moyenne	
	M6				Moyenne	
	M7				Grande	
	M8				Petite	
	M9				Petite	
	M10				Moyenne	
	S3				Petite	
	S3'				Moyenne	
	S4				Petite	
	S4'				Moyenne	

b) Sur milieu liquide

La croissance des bactéries apparaît sous forme de trouble homogène dans le milieu MRS liquide, ce trouble est concentré au fond du tube à la recherche des conditions anaérobiques de ces bactéries (Kihal, 1996 ; Carr et al., 2002).

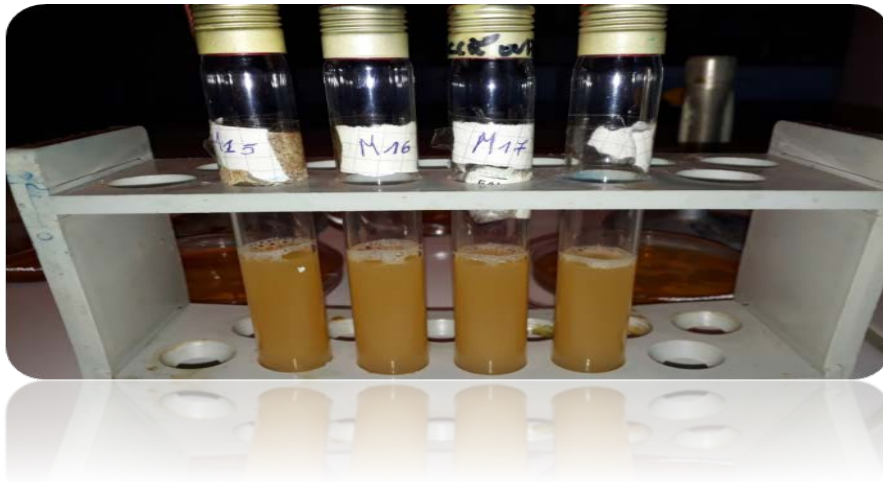


Figure 17 : Aspect d'une culture pure dans un milieu liquide.

IV.2.1.2. L'aspect microscopique

L'étude microscopique a été basée sur la coloration de Gram. L'observation microscopique a révélé que les colonies isolées et purifiées sont Gram positif, apparaissant sous différentes formes avec différents modes d'association. L'examen microscopique montre la dominance des formes cocci et coccobacilles à gram positif avec différents types de regroupement. Comme indiqué dans les paragraphes prochains, les isolats bactériens sont désignés selon un code composé de lettre (S ou M) et de numéro.

A partir d'une vingtaine de souches isolées, nous n'avons pu retenir que 14 isolats à l'état pur présumés lactiques et remplissant les critères établis pour cette catégorie.

L'aspect sous microscope après coloration de Gram, laisse apparaître la distribution d'un seul aspect cocco-cocobacille sous les modes de regroupement suivants :

Diplocoques, chaînes, amas, tétrades (**figure16**). La taille était petite à moyenne.

IV.2.2. Production de la catalase et de l'oxydase

L'activité catalytique de catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau, par la mise en contact des colonies avec quelques gouttes d'eau oxygénée.

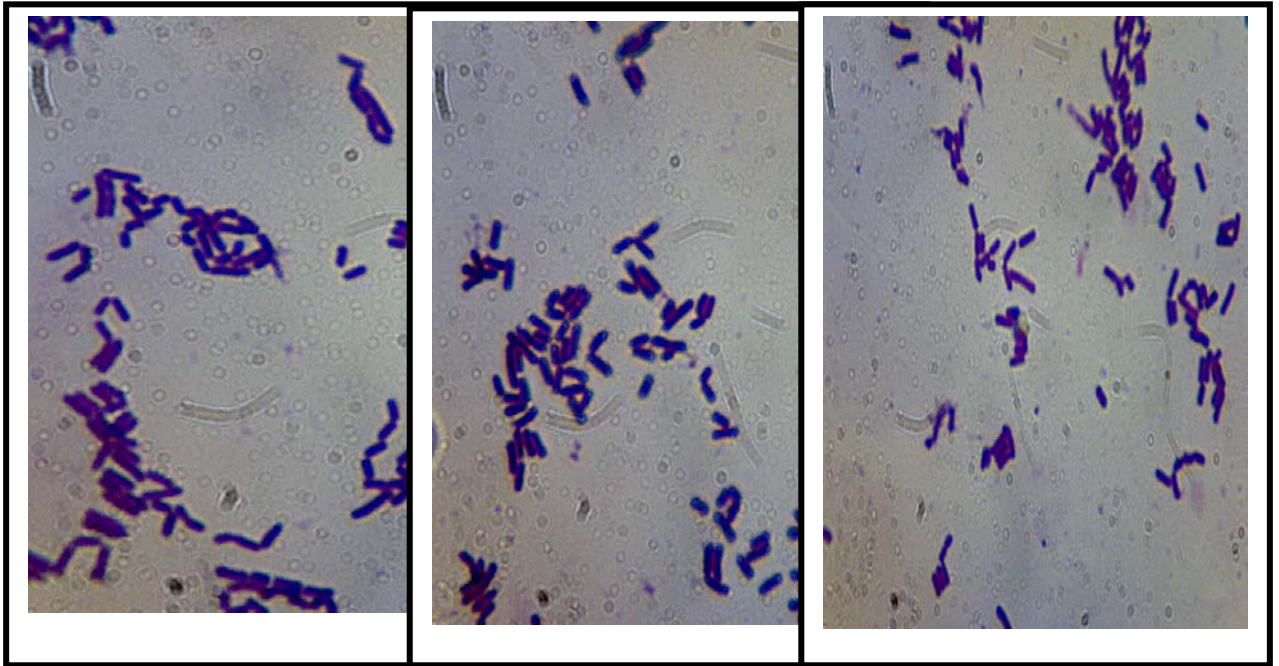


Figure 18 : Observation des bactéries lactiques isolées sous microscope optique (10x100) après coloration de Gram.

Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Guiraud, 2003).

Toutes les souches lactiques isolées sont catalase et oxydases négatives.

IV.3. Identification des souches

Après effectuer l'examen de la recherche de la catalase et la coloration de Gram, toutes les bactéries Gram positif et catalase négatif sont présumées comme bactéries lactiques (Kihal, 1996 ; Carr et al., 2002).

Les isolats Gram positif, catalases négatifs sont retenus pour compléter la suite de l'étude.

IV.3.1. Tests physiologiques et biochimiques

IV.3.1.1. Croissance dans les conditions hostiles

Ce test est réalisé dans le but de différencier les lactocoques des entérocoques.

IV.3.1.1.1. Culture sur milieu hypersalé

Sur un milieu hypersalé à différentes concentrations en NaCl (2, 4, 6.5%) testées, nous avons obtenu les résultats suivants :

Tous les isolas poussent à 2 et 4%. A 6.5% de NaCl, toutes les souches peuvent se résister et se développer ; l'exception est notée pour les souches M1, S3, S3', S4 et S4' (**Figure19**).

La croissance à cette concentration de 6.5% de NaCl permet de distinguer les lactocoques des entérocoques. Ces derniers peuvent y développer.

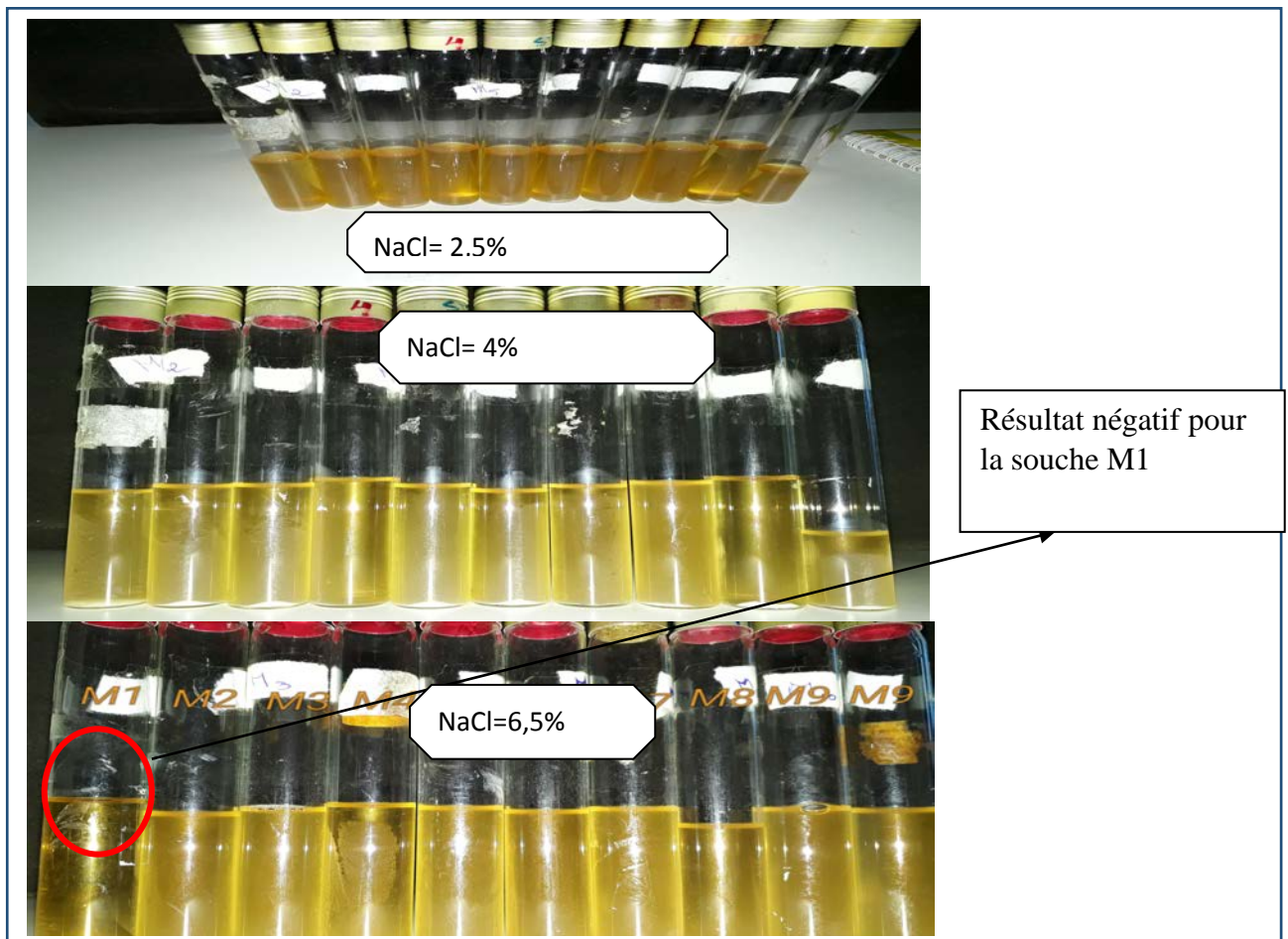


Figure19 : Résultats de croissance des souches aux différentes concentrations en NaCl.

IV.3.1.1.2. Croissance aux différents pH

Nous avons remarqué que toutes les souches isolées sont capables de croître sur milieu MRS liquide à pH 4 ou 9 (**Figure**).



Figure 20 : Test de croissance sur milieu hyperalcalin.

IV.3.1.1.3. Croissance à différentes températures

Une bonne croissance a été observée aux températures de 15 et 37°C, mais aucun de nos isolats était capable de pousser à 45°C.

IV.3.1.1.4. Thermorésistance

La plupart des souches isolées sont thermorésistantes, où nous avons observé une croissance sur le bouillon MRS après un traitement thermique pendant 30 minutes à 63.5°C suivant une incubation de 48h,

L'exception des souches **M1**, **M2**, **M3**, **M4** et **M5**, parmi les autres isolats, qui sont dépourvues de la thermorésistance (**figure21**).



Figure 21 : Test de thermorésistance.

IV.3.1.1.5. Type fermentaire

a. Test de production de CO₂ à partir du glucose

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé, il consiste à mettre en évidence la formation de CO₂ qui est piégé dans une cloche de Durham en milieu MRS glucosé pour les bacilles (Hassaine, 2013).

Ce test permet de différencier les isolats homolactiques des hétérolactiques après une incubation à 30°C pendant 24 à 72 heures (Hassaine, 2013).

La plupart des souches sont homofermentaires et fermentent le glucose (figure22) en lactate sans produire du gaz.



Figure 22 : Type fermentaire sur milieu MRS glucosé contenant la cloche de Durham.

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

b. Test de lait de Sherman

Ce test est basé sur le mode respiratoire des souches ensemencées.

Pour les résultats positifs, 13 souches parmi les 14 isolées qui ont réduit le bleu de méthylène à 1% (M8 était incapable) et seulement quatre souches (M3, M4, M5 et M6) ont réduit le bleu de méthylène à 3%. Cette dernière capacité est une caractéristique des entérocoques, elles vont tirer leurs oxygène depuis le bleu de méthylène présent dans le lait, donc ce dernier va perdre sa couleur (Figure23).



Figure 23: Résultats positifs et négatifs des cultures sur lait de Sherman (1%).



Figure 24: Résultats positifs et négatifs de culture sur lait de Sherman (3%).

Les lactocoques qui sont microaérophiles, sont incapables de réduire le bleu de méthylène à 3%, elles vont utiliser une petite quantité d'oxygène qui ne peut pas changer (ne peuvent pas réduire le potentiel redox) la couleur du lait donc il reste bleu.

c. Test de production de CO₂ à partir du citrate

Presque toutes les bactéries ont la capacité de production le gaz à partir de citrate (**figure25**). L'exception est noté pour les souches M2, M3, M7, S3, S3' et S4.

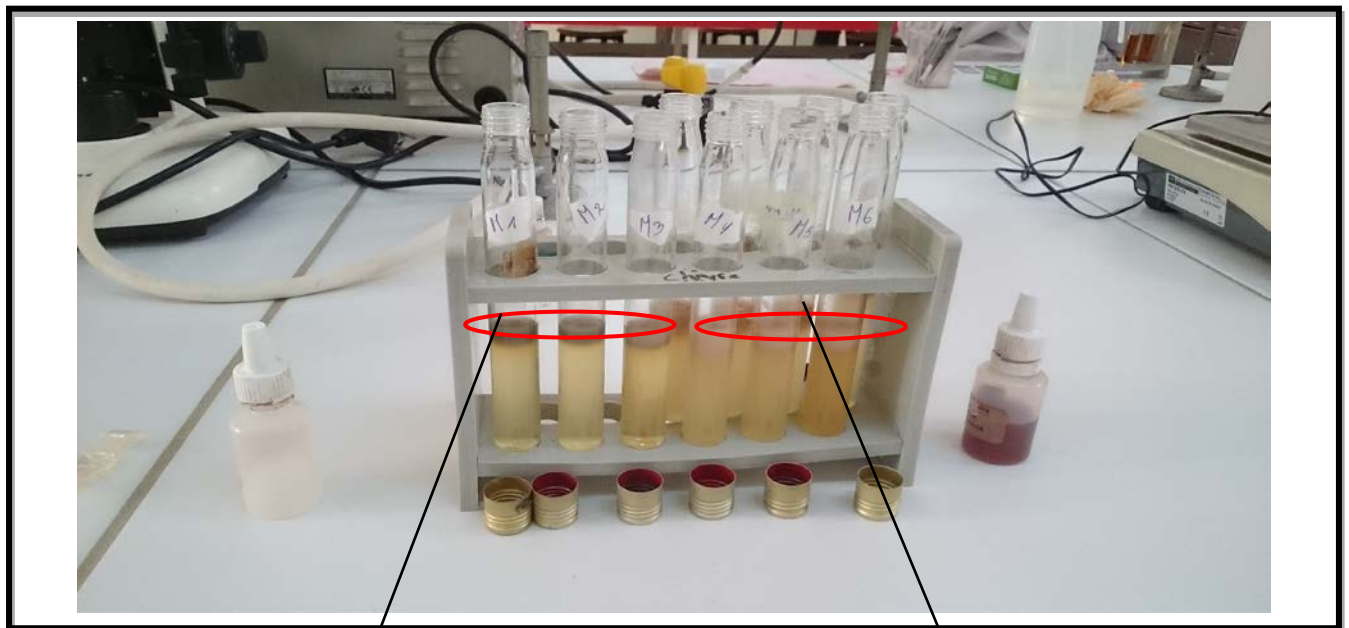


Figure 25: Test de production de CO₂ à partir du citrate.

d. Production d'acétoïne

La production d'acétoïne est testée sur milieu Clark et Lubs, toutes les bactéries produisent de l'acétoïne. Elles sont caractérisées au début par la présence des troubles dans le milieu et ensuite par la formation d'un anneau rouge sur la surface du milieu après l'ajout des deux réactifs VPI et VP II.

M4, M5, M6, S3, S4 ne produisent pas de l'acétoïne (l'absence de l'anneau rouge). Les autres isolats ont donné des résultats positifs (**figure26**).



Résultat positif : observation de l'anneau rouge.

Résultat négatif : absence de l'anneau rouge.

Figure 26: La mise en évidence de la production de l'acétoïne chez les isolats sur milieu Clark et Lubs.

IV.4.2. Tests technologiques

IV.4.2.1. La production de dextrane

Le milieu MSE est utilisé pour détecter la production des exopolysaccharides (la formation de colonies gluantes).

La production d'exopolysaccharides sur milieu saccharosé MSE est un critère important pour différencier entre les espèces de bactéries lactiques (**Kheddid et al., 2006**).

D'après ce test, toutes les souches lactiques isolées étaient capables de produire les exopolysaccharides.

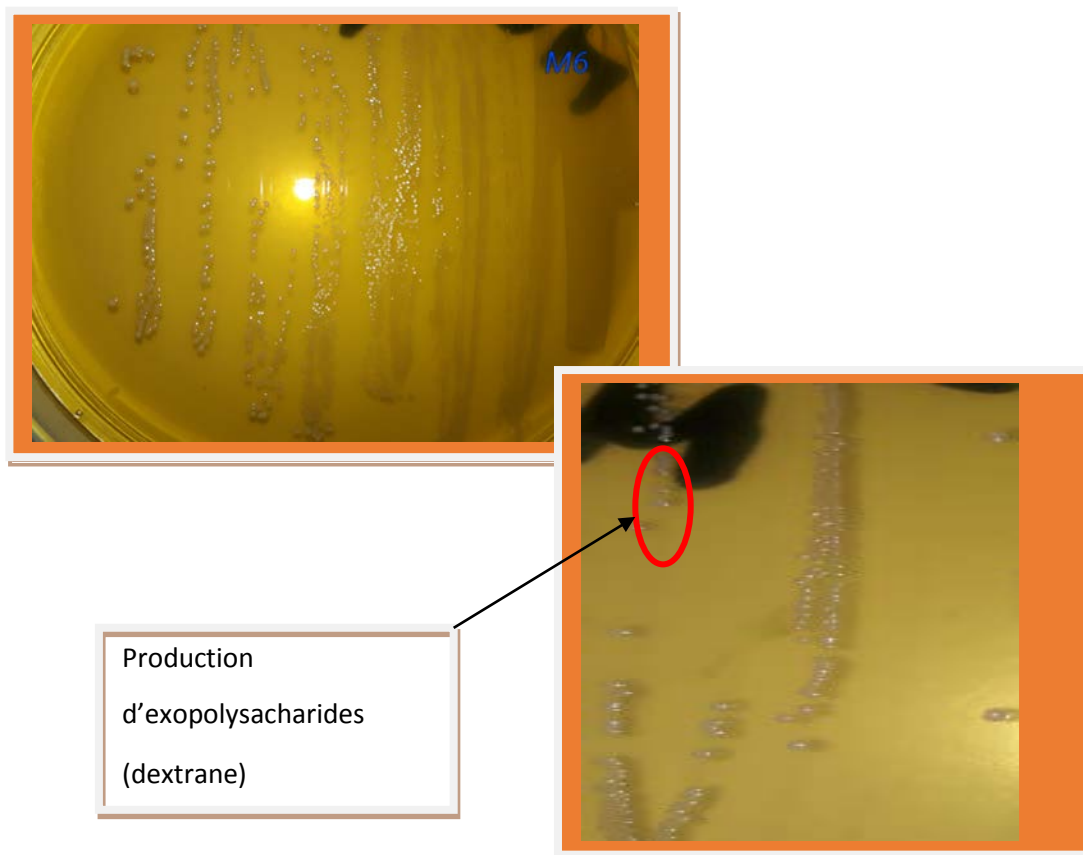


Figure 27: Test de production des exopolysaccharides (dextrane)

IV.4.3. Recherche de l'activité Arginine dihydrolase (ADH)

Sur milieu Moller à l'arginine, on observe que tous les isolats sont capables (**figure28**) d'utiliser l'arginine et ré-alkalinisent le milieu (cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine). La couleur de l'indicateur de pH demeure inchangée (mauve) qui est la couleur initiale (**Thomas, 1973**).

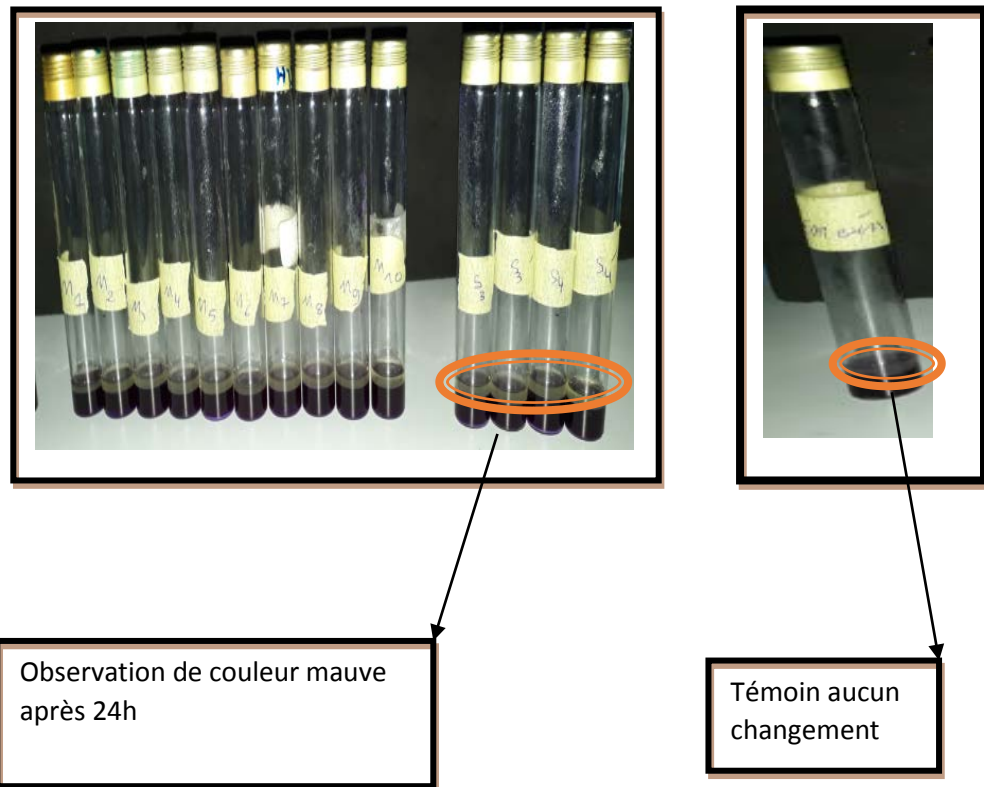


Figure 28: Résultat du test d'hydrolyse de l'arginine

IV.4.4. La détermination de l'activité inhibitrice vis à vis les souches pathogènes

L'activité antibactérienne des souches isolées a été étudiée par la techniques des puits contre un groupe de germes pathogènes intestinaux sensibles aux antimicrobiens : *E. coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 10876.

Les résultats sont exprimés en (cm), par mesure de la distance entre la limite de la colonie bactérienne et le début de la zone d'inhibition de la souche pathogène. Les souches présentant une zone claire d'extension latérale supérieure à 0,5cm sont considérées comme productrices de substance antimicrobiennes (**Fleming et al., 1975**).

Les boites de pétri ont été incubées à 37°C pendant 24h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (pré-diffusion) (**Doumandji et al., 2010**).

Les résultats (**tableau5**) ont révélé que toutes les souches testées présentent des zones d'inhibition appréciables traduisant une activité antimicrobienne assez acceptable. Les souches S3 et M8 ont affiché les meilleurs résultats (0.8cm et plus) avec tous les pathogènes testés.

Il faudrait noter que, mis à part les souches M1 et M5, nos souches isolées exercent une bonne activité inhibitrice à l'encontre de *Candida albicans* ATCC10231.

L'apparition d'une zone d'inhibition sous forme d'un halo peut être du soit, originaire de la production d'une substance inhibitrice.

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la bioconservation des aliments (**Labioui et al., 2005**). Les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes.

Tableau 4 : Diamètre d'inhibition (cm) exercée par nos isolats lactiques envers certaines souches pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires.

Souches pathogènes Isolats	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>
M1	0,7	0,7	0,4	0,5	0,5
M2	0,6	0,9	0,6	0,6	0,4
M3	0,4	0,7	0,6	0,7	0,6
M4	0,6	0,7	0,6	0,4	0,8
M5	0,8	0,7	0,3	0,6	0,6
M6	0,5	0,8	0,8	0,6	0,6
M7	0,5	0,8	0,7	0,5	0,5
M8	0,8	1	0,8	0,6	0,9
M9	0,5	0,9	0,6	0,7	0,7
M10	0,6	0,9	0,6	0,7	0,6
S3	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8
S3'	0,8	1	0,6	0,7	0,6
S4	0,6	1	0,7	0,6	0,5
S4'	0,6	0,9	0,8	0,7	0,5

IV.4.6. Résistance aux sels biliaries

Toutes les souches isolées et cultivées sur milieu MRS contenant 0.3% de bile développent un turbidité confirmant leur tolérance aux sels biliaries. Cette résistance a été confirmée par une deuxième mise en culture sur boîte de pétri (**figure29**).

Kimoto-Nira et al. (2009) ont rapporté que les facteurs influençant la résistance des lactocoques à la bile sont associés à la composition du milieu de croissance. Ils ont prouvé que la résistance à la bile de quelques souches de *Lactococcus* a été changée quand le sucre dans le milieu est changé du glucose en lactose. En d'autres termes, l'exclusion de la bile par les bactéries exige de l'énergie. Les hydrates de carbone qui sont facilement ou rapidement métabolisés pour apporter cette énergie, augmentent la résistance aux sels biliaries. D'autre part, et comme la bile est un détergent, la résistance aux sels biliaries semble être associée à la stabilité de la membrane cellulaire.

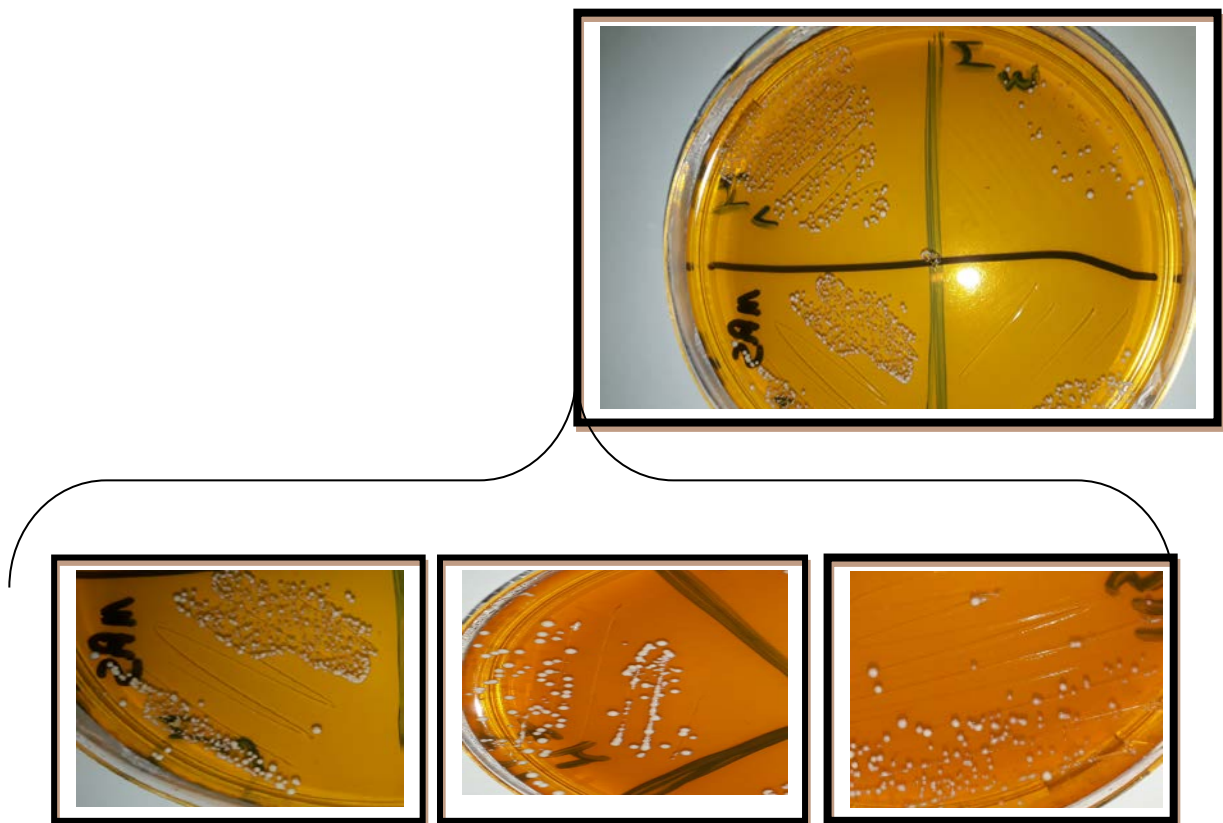


Figure 30 : test de croissance en présence des sels biliaries.

Tableau5: Résultats des tests phénotypiques, biochimiques et physiologiques des souches lactiques isolées de l'eau d'olive

Souches	Catalase	Gram	Oxydase	Type fermentaire	Croissance à différentes concentration de NaCl			Croissance à différentes températures			Croissance à différents pH	Thermo-résistance	production de CO ₂ à partir du	ADH	Production des Exopolysachari	de la production d'acétone	croissance en présence de bleu de méthylène		Résistance aux sels biliaires	substances antimicrobiennes
					2,5%	4%	6.5%	15°C	37°C	45°C							pH 9.5	0,1		
M1	-	+	-	Hom	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
M2	-	+	-	Hom	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
M3	-	+	-	Hom	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M4	-	+	-	Hom	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
M5	-	+	-	Hom	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
M6	-	+	-	Hom	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M7	-	+	-	Hom	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M8	-	+	-	Hom	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M9	-	+	-	Hom	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
M10	-	+	-	Hom	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S3	-	+	-	Hom	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S3'	-	+	-	Hom	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
S4	-	+	-	Hom	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
S4'	-	+	-	Hom	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+

+ : test positif ; - : test négatif ; **ADH** : Arginine dihydrolase, **Hom** : homofermentaire.

Discussion générale et Conclusion

L'eau de fermentation des olives d'une manière naturelle (avec addition de sels de table seulement) constitue un milieu favorable pour le développement des bactéries lactiques acidophiles.

Les micro-organismes de ce milieu de culture vont se mettre à croître à une vitesse dépendante de la variété des olives choisies, du prétraitement subi, de la concentration en sel etc. Les bactéries Gram-négatives ont tendance à croître en premier, suivies par les lactobacilles Gram-positifs. Lorsqu'on ajoute de l'acide lactique afin d'abaisser le pH de la saumure à 4,5-5, les bactéries d'altération sont défavorisées par rapport aux bactéries lactiques qui tolèrent bien les milieux acides.

On peut distinguer trois phases dans la fermentation :

1. les premiers 7 à 14 jours : au début les bactéries aérobies, à Gram négatif (comme *Pseudomonas* spp ou *Enterobacteriaceae*) sont dominantes. Mais la croissance rapide des bactéries lactiques *Leuconostoc mesenteroides* ou des *Enterococcus* et *Pediococcus* se fait au détriment des bactéries à Gram négatif *Aeromonas* (pathogène des eaux souillées), *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* etc.
2. après 2 à 3 semaines, *Leuconostoc mesenteroides* (Arg-, CO₂, mésophiles) prédomine et acidifie la saumure. C'est une bactérie lactique hétérofermentaire qui convertit le glucose en acides D-lactique et acétique, en conditions d'anaérobiose. On la trouve aussi dans la fabrication de la choucroute où elle domine fortement en début de fermentation. Dans cette seconde phase, apparaissent aussi les lactobacilles *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum*.
3. dans la phase finale, les lactobacilles prédominent et fermentent les sucres diffusant du fruit vers la saumure (**Dridier et Prevost, 2009**).

Nos 14 isolats étaient tous des mésophiles, incapables de croître à 45°C. A ce niveau, et selon les critères macro et microscopiques obtenus, trois genres bactériens peuvent être imposés dans l'identification de ces isolats ; à savoir : *Enterococcus* sp., *Leuconostoc* sp. et *Lactococcus* sp.

Dans une deuxième étape d'identification et en présence de 6.5% de NaCl, toutes les souches pouvaient se résister et se développer ; l'exception était notée pour les souches Ce test nous a permis de distinguer partiellement les entérocoques des lactocoques. Les derniers ne peuvent pas croître au-delà d'une concentration de sel de plus de 4%. Donc, M1, S3, S3', S4 et S4' sont probablement des lactocoques et le test sur lait de Sherman à 3% nous a confirmé l'identité de ces isolats.

Seulement quatre souches (M3, M4, M5 et M6) réduisent la couleur bleu de l'indicateur coloré rajouté à 3% ; ce qui laisse prédire qu'il s'agit probablement des entérocoques.

Les bactéries lactiques sont à la base de la fabrication de fromages, de yaourts et de laits fermentés. Dans l'industrie laitière, l'acide citrique présent dans le lait est considéré comme le principal précurseur de la formation des composés aromatiques appréciés comme l'acétate, l'acétoïne (odeur de beurre) et le diacétyl (odeur de fromage). Dans le présent travail, les souches M2, M3, M7, S3, S3' et S4 étaient incapables de métaboliser le citrate. De même, les souches M4, M5, M6, S3, S4 ne produisent pas de l'acétoïne ; ce qui traduit leur incapacité de produire les composés aromatiques.

Le test d'utilisation de l'arginine nous a montré que tous nos isolats lactiques ont donné un résultat positif ; ce qui exclut leur appartenance au genre *Leuconostoc* sp.

L'aspect technologique de nos isolats est partiellement confirmé par la méthode utilisée ici dans la détection de dextrans. Ces polysaccharides sécrétés sembleraient étroitement liés à la concentration et la nature des nutriments dans le milieu de culture. Sur milieu lait, cette synthèse de dextrans, chez *L. bulgaricus* par exemple, est stimulée par l'ajout d'hydrolysats de caséines (Cerning et al., 1992). Toutefois, cette stimulation est absente dans le milieu MRS (Garcia-Garibay et Marshall, 1991). Ce qui nous amène dans la continuité de ce travail, à revoir d'autres techniques de qualification et de quantification de ces polysaccharides.

L'activité antimicrobienne de tous les isolats purifiés et obtenus dans cette étude ont aussi montré un large spectre contre les bactéries suivantes *E. coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 10876 ; responsables de toxi-infections alimentaires. Cette qualité reflète un critère clef chez les bactéries probiotiques qui lorsqu'elles sont administrées à des doses adaptées peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine en réduisant les

infections gastro-intestinales induites par les toxines microbiennes. Nos résultats ont montré que les souches les plus antagonistes sont S3 et M8 où les zones d'inhibition mesurés étaient toutes supérieures ou égales à 0.8 cm envers les pathogènes testés. Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (Titiek et al., 1996 ; Labioui et al., 2005).

Un autre critère d'identifications des bactéries probiotiques est leur résistance à la bile. Efficacement, tous les isolats étaient capables de croître en présence de 0.3% de bile.

Ce travail reste une première ébauche dans l'identification microbiologique des bactéries lactiques fermentant les olives, nous souhaiterons qu'il soit complété par une identification microbiologique et/ou biochimique plus poussée avant de mettre en évidence le caractère probiotique de ces isolats.

-A-

- **Alloum D., 1974.** L'oléiculture algérienne. Options méditerranéennes n°24. Pp : 45-48.
- **Argenson C ; Régis S ; Jourdain J.M et Vaysse P., 1999.** L'olivier. Ed : centre technique interprofessionnel des fruits et légumes. 204p.
- **Artaud M., 2008.** L'olivier, Sa contribution dans la prévention et le traitement du syndrome métabolique.
- **Axelsson L.. 2004.** Classification and physiology. *In* : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York.1-66.

-B-

- **Babouche N et Kellouche A., 2012.** Etude de l'entomofaune de l'olivieraie dela région de Tizi-Ouzou. 6p. Laboratoire d'entomologie. Département de Biologie. Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques. Université de Tizi-Ouzou Algérie.
- **Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R.. 2005.** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». *Sciences & Technologie N°23*. Pp :30-37.
- **Banziger E., (1998).** L'olive cuisine et santé. Éd Viridis- 2800 Delémond, Suisse.
- **Belaj A ; Trujillo I ; de la Rosa R et Rallo L., 2001.** Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 126, 64-71.aj et al., 2001).
- **Benabid H., 2009.** Caractérisation de l'huile d'olive algérienne : Apports des méthodes chimométriques. Thèse de doctorat en sciences. Université de Constantine. Pp : 1-38.
- **Benderradji L ; Bouzerzour H ; Ykhlef N ; Djekoun A et Kellou K., 2007.**
Réponse à la culture in vitro de trois variétés de l'olivier (*Olea europaea* L.).
Sciences et Technologie C-N°26, décembre 2007, pp.27-32.
- **Bensemmane A., 2009.** L'oléiculture: Développons le secteur de l'Huile d'Olive en Algérie. *Revue Fillaha Innove N°4* Avril-Mai 2009. 23p

- **Benettayeb Z.E., 1993.** Biologie et écologie des arbres fruitiers. Ed. O.P.U.Alger. 140p.
- **Besnard G., 2009.** Génétique et évolution des plantes en milieu méditerranéen et tropical. Université de Lille 1. 45p.
- **BOURGEOIS C.M., LARPENT J.-P.** Microbiologie alimentaire - Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tome 2. Tec & Doc. 1996, 704p.
- **Bracci T ; Sebastiani L ; Busconi M ; Fogher C ; Belaj A et Trujillo I., 2009.** SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Sci Hortic* (122):209–215.
- **Breton, A. (1985).** Identification des moisissures. Dans : Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. Botton *et al.*, Ed. Masson Paris, pp : 34-209.
- **Breton C ; Medial F ; Pinatel C et Berville A., 2006.** De l'olivier à L'oléastre : Origine et domestication de *Olea europaea L* dans le Bassin méditerranéen .Cahiers agricultures vol.15, n°4, juillet-août 2006.

-C-

- **Chase M.W. and Reveal J.L.. 2009.** A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*.161:122–127.
- **Chol P ; Lauri P-E et Moutier N., 2005.** L'olivier. In De la taille à la conduite des arbres fruitiers. Editions du Rouergue, Parc Saint-Joseph. Pp : 193-208.
- **Calvez S., Belguesmia Y. Prévost H., Drider D. et Kergourley G.. 2009.** Les bactériocines : de la synthèse aux applications. Bactéries lactiques : physiologie , métabolisme, génomique et applications industrielles édition : Economica .Paris.
- **Camps-Farber H., 1974.** L'olivier et son importance économique dans l'Afrique antique. L'olivier. Paris : CIHEAM (Options méditerranéennes n°24). Pp : 21-28.
- **Cantini C ; Cimato A et Sani G., 1999.** Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. *Euphytica* 109:173–181.
- **Cavallès H., 1938.** L'olivier dans le bassin méditerranéen. In: *Annales de Géographie.*, t. 47, n°270. pp. 617-620.

- **Cerning J, Bouillanne C, Landon M, Desmazeaud M (1992).** Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 75: 692-699.
- **Codex alimentarius.2003.** Codex standard for fermented milk.CODEX STAN.243:1-5.
- **C O I., 1998.** L'olivier, l'olive, l'huile. Pp : 1-18.
- **C.O.I. (2001).** Norme commerciale applicable à l'huile d'olive et à l'huile de grignon d'olive. Conseil Oléicole International.) T.15/NC n°2/Rev.10. Principe de Vergara, 154, 28002 Madrid, Espagne.
- **Collins, M.D., Farrow J.A.E., Phillips, B.A. and Kandler, O. (1983).** *Streptococcus garviae* sp. Nov. and *Streptococcus plantarum* sp. Nov. *Journal of General Microbiology*, **129**, pp: 3427-3431.
- **Cronquist A. (1988).** The Evolution and Classification of Flowering Plants, 2nd edition Bronx, N.Y USA: The New York Botanical Garden, page 145.

➤

-D-

- **Daly C., Fitzgerald G. F., O'connor L. and Davis R.. 1998.** Technological and health benefits of dairy starter cultures. *International Dairy Journal* **8**,195-205.
- **Davis larone, H. (1987).** Medically important fungi. A guide to identification. 2nd edition Elsevier, London, 230 p.
- **De Man J. C., Rogosa M. and Sharpe M. E.. 1960.** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. appl. Bacteriol*, 23, 130-135.
- **Derache, PH., et Derache, R. (1986).** Toxicité des champignons. Dans :Technologie et sécurité des aliments. pp : 199-228. Tech. et Doc. Lavoisier, Paris.
- **Djamel DRIDER et Hervé PREVOST,** Bactéries lactiques, Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles, *Economica*, 2009, 593 p.
- **DeVosP.,GarrityG.M.,JonesD.,KriegN.R.,LudwingW.,RaineyF.A.,Schleifer**

K. H. and Whiteman W. B.. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Second Edition. Volume Three. Springer.

- **Dupont F. et Guignard G-L.. 2012.** Botanique : Les familles de plantes . 15^e édition.

ELSEVIER MASSON S.A.S.

- **Dworkin I. and Gibson G.. 2006.** Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-beta signaling contributes to variation for wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 173:1417–1431.

-E-

- **Embley, T. M. and E. Stackebrandt (1994).** "The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes."

-F-

- **FAO, 2003.** L'olivier : contraintes et potentialités. Projet "Assistance au Recensement Agricole". Liban.

- **FAO/OMS. 2001.** Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivante. Organisation des Nations Unies Organisation mondiale de la santé pour l'alimentation et l'agriculture. Cordoba, Argentine.

- **FAOSTAT., 2013.** Site web : <http://faostat.fao.org/>

- **Fernandez-Escobar R., 1993.** Techniques culturales pour le contrôle de la fructification chez l'olivier. *Revue Olivae* N°46 avril 1993. Pp38-41. *Annual Review of Microbiology* 48(1): 257-289.

- **Fuller R.** Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365-78.

-G-

- **Garvie, E.I. and Farrow, J.A.E. (1982).** *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* (Orla-Jensen) comb. nov. and *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. (Matuszewski *et al.*) nom. rev., com. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32, pp: 453-455.

- **Garcia-Garibay, M. and Marshall, V.M.E. (1991)** Polymer Production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 325-328.

- **Gaussen H., Leroy J-P., Ozenda P., (1982).** Précis de botanique .Tome II : végétaux supérieurs. Ed. Masson, Paris, page. 110.
- **Ghedira K., 2008.** L'olivier. Phytothérapie, volume 6. Pp : 83-89.
- **Grangette C.. 2011.**Nutrithérapie Probiotiques et régulation de la réponse immunitaire : impact sur les maladies allergiques et les maladies inflammatoires intestinales. Phytothérapie 9: 93–99.
- **Green PS., 2002.** A revision of *Olea* L. (*Oleaceae*). *Kew Bull.* **57**: 91-140.
- **Guerbaa H., 1988.** Situation et tendances de l'offre et de la demande des principaux produits de l'olivier. CIHEAM, Options Méditerranéennes. Pp : 11-26.
- **Guiraud, JP.,(1998).** Analyse du lait. *In* : Microbiologie alimentaire, *Ed.Dunod* Paris.*Pp*: 390-391
- **Guiraud J.-P.** Microbiologie alimentaire. Dunod – RIA. 2003, 696.
- **Guiraud J.P. et Rosec J.P.. 2004.** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR.* 237-251.

-H-

- **Haddie J.M.. 1986.** Other streptococci. Bergey's manual of systematic bacteriology (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). **1** :1070.
- **Hadef S.. 2012.** Evaluation des aptitudes technologiques et Probiotiques des bactéries lactiques locales. Mémoire de Magister. Université Kasdi MerbahOuargla.
- **Hannachi H ; Breton C ; Monji M ; Ben EI ; Hadj S ; Gazzah M et Berville A., 2008.** Differences between native and introduced olive cultivars as revealed by morphology of drups, oil composition and SSR polymorphisms: a case study in Tunisia. *Sci Hort* 116:280–290.
- **Hannachi H., M' sallem M., Benalhadj S., El-Gazzah M. (2007).** Influence du site géographique sur les potentialités agronomiques et technologiques de l'olivier (*Olea europaea*) en Tunisie. *C.R. Biologies* 330, p 135-142.
- **Henry S. (2003),** L'huile d'olive, son intérêt nutritionnel, ses utilisations en pharmacie et en cosmétique. Thèse : université Henri-Poincaré – Nancy. Page 9 -13.
- **Holzappel W.H., Franz C.M., Ludwig W. and Dicks L.M.T.. 2009.** Genus *Pediococcus*.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Second Edition. Volume Three. Springer.

- **Hugenholtz J., Sybesma W., Groot M. N., Wisselink W., Ladero V., Burgess K., Van Sinderen D., Piard J.C., Eggink G., Smid E. J., Savoy G., Sesma F., Jansen T., Hols P. and Kleerebezem L M. 2002.** Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek* 82. P217-235.

-I-

- **Idrissi A et Ouazzani N., 2003.** Apport des descripteurs morphologiques à l'inventaire et à l'identification des variétés d'olivier (*Olea europaea* L.). Plant genetic resources newsletter (136), pp. 1-10.
- **Isolauri E., Arvola T. Sutas Y., Moilanen E., Salminen S.** Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1604-10.
- **Isolauri, E., P. V. Kirjavainen and S. Salminen (2002).** "Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation?" *Gut* 50(90003): 54-59.
- **Izquierdo Alegre E.. 2009.** Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg

-K-

- **Kadereit W. et Bresinsky A.. 2013.** Systematics and phylogeny. Strasburger's Plant Sciences. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. P665-1037.
- **Kimoto-Nira H., Kobayashi M., Nomura M., Sasaki K. et Suzuki C., 2009.** Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition: Analysis by using different growth media. *Int. J. Food Microbiol.* 131: 183-188.
- **Klein G., Pack A., Bonaparte C., Reuter G. (1998),** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* vol. 41,103- 125.
- **Krieg N.R. (2001)** The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria - Identification of procaryotes. **In** *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Garrity G. M., Boone D. R., Castenholz R. W. Williams and Wilkins, Baltimore., 721, 33 –

-L-

- **Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhsine M., 2005.** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 144 : 237-250.
- **Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S. and Wright A.V.. 2012.** Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects Fourth edition Taylor & Francis Group. Boca Raton London NewYork Larpent-Gourgaut M. , Michaux O. , Larpent J. P. , Desmasures N. , DesmazeaudM.
- **Langella P., Nouaille S., Commissaire J., Bolotine A.,Gruss A. et Le Loir Y.. 2001.** Characterization of host factors affecting heterologous protein secretion in Lactococcus lactis. Lait 81,19-28.
- **Larpent-Gourgaut M. , Michaux O. , Larpent J. P. , Desmasures N. , DesmazeaudM., Mangin I. , Masson F. ,Montel M.C. et Tailliez P.. 1997.** Les ferments lactiques et bactéries apparentées in: in : «Microbiologie alimentaire ». ed. Larpent, Tec. Doc., 1ère Ed., Lavoisier, Paris
- **Larpent, J.P. (1989).** Les bactéries lactiques, Les microorganismes de fermentations. Dans : Microbiologie alimentaire, Tome 2, Bourgeois, C.M., Larpent, J.P., Eds. Techniques et documentation Lavoisier, pp: 3-15.
- **Lilly, D. M. and R. H. Stillwell (1965).** "Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms."Science 147(3659): 747-748.
- **Linos, A., Nikoloudakis, N., Katsiotis, A., Hagidimitriou, M., 2014.** Genetic structure of the Greec olive germoplasm revealed by RAPD ISSR an SSR markers. Sci. Hortic. 175, 33-43.
- **Loussert R., Brousse G. (1978).** L'olivier ; Ed. G.P. Maisonneuve et Larose. Paris,462p.

-M-

- **Maillard R. (1975).** L'olivier, Ed comité technique de l'olivier, Paris, page 75
- **Mangin I. , Masson F. ,Montel M.C. et Tailliez P.. 1997.** Les ferments lactiques et bactéries apparentées in: in : «Microbiologie alimentaire ». ed. Larpent, Tec. Doc., 1ère Ed., Lavoisier, Paris.
- **Massissilia Ch., 2012.** La production d'huile d'olive en Algérie Un potentiel mal exploité.

- **Mayeux, J.V., Sandine, W.E., Elliker, P.R., (1962).** A selective medium for detecting leuconostoc organisms in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science* 45, 655–660
- **Mäyrä-Mäkinen, A., et Bigret, M. (1998).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Salminen S., et Von Wright A. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. 73- 102.
- **Mehri H et Kemoun-Mehri R., 1995.** Biologie florale de l'olivier : problèmes de l'auto-incompatibilité chez la variété « Meski » et recherche de pollinisateurs. *Revue Olivae* N 0 55. Pp35-38.
- **Mendil M et Sebai A., 2006.** Catalogue national des variétés de l'olivier. 100p.
- **Mendil M., 2009.** L'oléiculture: Expériences algériennes. *Revue Fillaha Innove* N°4 Avril-Mai 2009. 23p
- **Miner J.M.M., 1995.** L'huile d'olive, un luxe quasi éternel. *Revue Olivae* N°59 décembre 1995. Pp36-37.
- **Moroni O.. 2007.** Contribution a l'étude du rôle des probiotiques dans le contrôle et la prévention des infections enteriques à *listeria monocytogenes*: analyse *in vitro* et étude *in vivo* des mécanismes d'action antimicrobien. Thèse de doctorat. Université Laval. P:146
- **Moreau, C. (1989).** Les moisissures. Dans : *Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire*. Bourgeois, C.M., Mescle, J.F. et Zulla, J., (1), pp : 174-185.
- **Müller, T., (1990).** Comparison of methods for differentiation between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Zentralbl. Mikrobiol.* 145, 363–366.
- **Muller, J. A., R. P. Ross, G. Fitzgerald and C. Stanton (2009).** Manufacture of probiotic bacteria. *Prebiotics and probiotics science and technology*. New York, USA, Springer Science.
- **Muzzalupo I ; Vendramin G.G et Chiappetta A., 2014.** Genetic Biodiversity of Italian Olives (*Olea europaea*) Germplasm Analyzed by SSR Markers. *The Scientific World Journal*, 12 pages.

-N-

- **Nielsen D.S., Jacobsen T., Jespersen L., Koch A.G., Arneborg N. (2008)** Occurrence

and growth of yeasts in processed meat products - Implications for potential spoilage. *Meat Science.*, vol. 80,9 19-926.

- **Novel, G.. 1993.** Les bactéries lactiques. *Microbiologie industrielle, les Micro-organismes d'intérêt industriel.* Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech.et Doc.Lavoisier Paris, pp:170-374.

-O-

- **Orla-Jensen, S., (1919).** The lactic acid Bacteria. *Mem.Acad.Roy.Sciens.*5, 81-197.
- **Orla-Jensen, S. (1924).** "La classification des bactéries lactiques. ." *Lait* 4(468-474).
- **Ouazzani N ; Lumaret R et Villemur P., 1995.** Apport du polymorphisme alloenzymatique à l'identification variétale de l'Olivier (*Olea europaea* L.). *Agronomie* 15:31-37.

-P-

- **Pagnol J., 1975.** L'olivier. Ed. Librairie Lavoisier, France. 3^{ème} édition. Pp 17-150.
- **Parker R.** Probiotics, the other half of antibiotic story. *Anim Nutr Health* 1974;29:4-8.
- **Penner R., Fedorak R.N. and Madsen K.L.. 2005.** Probiotics and nutraceuticals: non medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Current Opinion in Pharmacology* 5: 596-603.
- **Pesson P et Louveaux J., 1984.** Pollinisation et productions végétales.
Ouvrage collectif. INRA, Paris. Pp : 169-172.
- **Pilet M.F., Magras C. et Federighi M.. 2005.** Bactéries lactiques. *In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica.* Paris.219-240.
- **Prescott LM, Harley JP, Klein DA (2003).** Les bactéries: les Gram positif pauvre en GC. *In : « Microbiologie ».* 2^{ème} édition Française. Paris, pp. 529-572.

- Q-

- **QAIC (Quebec Amerique International Collectif), 2008.** La miniencyclopédie des aliments. Les éditions Québec Amérique inc. Pp : 45-46.

-R-

- **Roquebert, M.R. (1997).** Les moisissures. Dans : Nature, biologie et contamination. Site Internet <http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/cours/roqueber.htm>.
- **Ruby J., 1918.** Recherches morphologiques et biologiques sur l'olivier et sur ses variétés cultivées en France. Thèse de doctorat. Faculté des sciences de paris, France. 285p.

-S-

- **Sachdeva A. and Nagpal J.. 2009.** Effect of fermented milk-based probiotic preparations on *Helicobacter pylori* eradication: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 21(1):45-53.
- **Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D.E., Previst H. et Kihal M.. 2002.** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides d'Algérie. *Journal Algérien des Régions Arides.* 01:01-14.
- **Sbitri M O., 2009.** Le marché mondial de l'huile d'olive et des olives de table, bilan et perspectives 2009/2010. Journées Méditerranéennes de l'Olivier du 19 au 21 octobre 2009 à Meknès.
- **Schleifer K.H., 1987.** Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters.* 46 :201-203.
- **Sherman, J.M., (1937).** The *Streptococci*. *Bacteriol. Rev,* 1: 3 -97.
- **Stiles M.E. and Holzapfel W.H.. 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36 :1-29.

-T-

- **Terzaghi B. E and Sandine W. E., 1975.,** "Improved Medium for Lactic Streptococci and Their bacteriophages," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 29, No. 6. pp. 807-813.
- **Tissier, H. (1900).** Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (Etat normal et pathologique). Paris, Université de Paris: 253.
- **Tong J.L., Ran Z.H., Shen J., Zhang C.X. and Xiao S.D.. 2007.** Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 25:155-68.

- **Tosukhowong A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D., Sonomoto K.**(2005) , Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. Journal of Bioscience and Bioengineering. vol. 99, 30-37.
- **Trujillo I ; Rallo L et Arus P., 1995.** Identifying Olive cultivars by Isozyme Analysis. Journal of the American Society for Horticultural Science 120(2):318–324.
- **Titiek F.D., Endang S.R., Djoko W. et Slamet S., 1996.** Antimicrobial substance produced by lactobacillus sp. TGR-2 isoleted from Growol. Indonesian. Food Nutr. Prog. 3(2) : 29-34.

-V-

- **Veillet S. (2010).** Enrichissement nutritionnel de l’huile d’olive : Entre Tradition et Innovation. Thèse/ Académie d’Aix-Marseille Université d’Avignon et des pays de Vaucluse- sciences des procédés – sciences des aliments.
- **Ventura, M., D. van Sinderen, G. F. Fitzgerald and R. Zink (2004).** "Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria." Antonie van Leeuwenhoek **86**(3): 205-223.
- **Vizoso Pinto M.G., Franz C.M.A.P., Schillinger U. et Holzapfel W.H.. 2006.** *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J.Food Microbiol* **109** :205-214.

-W-

- **Wallander E et Albert VA., 2000.** Phylogeny and classification of *Oleaceae* based on *RPS16* and *TRNL-F* sequence data. *Amer. J. Bot.* **87**: 1827-1841.
- **Waligora-Dupriet A.J., Rodriguez B. et Butel M.J.. 2011.** *Nutrithérapie* : Probiotiques et prévention de l’allergie : quel intérêt ?. *Phytothérapie* **9**:82–92.

-Z-

- **Zhang H. et Cai Y.. 2014.** Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice. Springer Dordrecht Heidelberg New York London P:535.
- **ZAIDI O., 2002.** Caractérisation du fromage traditionnel *bouhezza*;caratirisation physicochimique et microbiologique. Mémoire d'ingénieur INATAA. Constantine, Algérie.

- **Zarour K., 2010.** Contribution à l'étude microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées de différents écosystèmes. Mémoire de Magister. Université D'OranEs-Senia.

Milieux de culture

1. Milieu d'isolement :

-Milieu MRS (Man Rogosa et Sharpe,1960) :

FORMULE – TYPE (pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales) Ce milieu est recommandé pour la croissance des Lactobacilles.

○ Composition (g/l) :

-extrait de levure.....	4
-extrait de viande.....	8
-peptone.....	10
-acétate de sodium trihydraté... ..	5
-citrate d'ammonium.....	2
-glucose.....	20
- hydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄).....	2
-sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄).....	0.25
-sulfate de magnésium tétrahydraté (MnSO ₄).....	0.05
-agar.....	15
-eau distillée.....	1000ml

- pH= 5.4 et 6,8. Autoclavage 120°C pendant 20 min.

Pour le **MRS CaCo₃** on ajoute juste du carbonate de calcium a raison de **0,5g/100ml**.

-**MRS liquide** tous les ingrédients de MRS solide mais sans agar.

-Milieu M17 AGAR (Terzaghi et Sandine, 1975) :

Ce milieu est recommandé pour la croissance des coques lactiques.

○ Composition (g/l) :

-Peptone de farine de soja.....	5
---------------------------------	---

-Peptone de viande	2.5
-Peptone de caséine Trypsique	2.5
-Extrait de levure	5
-Extrait de viande	5
-Lactose	5
- Acide ascorbique.....	0.5
- Glycérophosphate de sodium	19
-Sulfate de magnésium	0.25
-Agar (manque dans le bouillon).....	20
-Eau distillée	1000ml

-pH= 7.2 Autoclavage 120C°pendant 20munité

-Milieux MSE (Mayeux; Sandine et Elliker, 1962) :

Ce milieu est recommandé pour la croissance des Leuconostoc.

o Composition (g/l) :

-Tryptone	10
-Gélatine	2,5
-Extrait de levure	5
-Saccharose	100
-Glucose	5
-Citrate de sodium	1
-Azides de sodium	75mg
-Agar-agar	15g
-Eau distillée.....	1000ml

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 6,9 ± 0,2.

-Milieu PCA (*Plate count agar*) :

-Tryptone	5g
-Extrait de levure	2,5g
-Glucose	1g
-Agar.....	15g
-Eau distillée	1l

-Eau peptone:

-Chlorure de sodium	5g
-Peptone de viande	10g
-Tryptone.....	10g
-Cystéine.....	0,5g
-Eau distillée	1l

-pH=7. Autoclavage 120°C pendant 20min

2- Milieux d'identification

-Milieux Moller

-Peptone pepsique.....	5g
-BCP(pourprede Bromocrésol).....	0,01g
-Extrait de viande	5g
-Rouge de crésol	0,005g
-Glucose.....	0,5g
-Pyridoxal.....	0,005g
-Arginine.....	10g
-Eau distillée.....	1l

-Clark et Lubs :

-Peptone.....	5g
-Phosphate dipotassique.....	5g
-Glucose.....	5g
-Eau distillée.....	950ml

-Ph=7,4. Autoclavage 120°C pendant 20min

-lait écrémé :

- lait écrémé en poudre	10g
-Extrait de levure	0,5g
-Eau distillée	1l

-Autoclavage 110°C pendant 10min

-Bouillon hypersalé :

-Extrait de viande	5g
-Glucose	5g
-Peptone	15g
-NaCl	25/40/65g
-Eau distillée	1l

Ph=7,2. Autoclavage 120°C peandant 20 min

-Milieu Muller –Hinton (Muller et Hinton, 1941):

-Infusion de viande de bœuf.....	3000ml
-Peptone de caséine.....	17,5g
-Amidon de maïs.....	1,5g
-Agar-agar.....	17g
-Eau distillée	1l

-pH=7,4. Autoclavage: 120°C pendant 20minutes.

-Eau physiologique peptonée :

- Chlorure de sodium8,5g
- Peptone.....0,5g
- Eau distillée950ml
- pH=7. Autoclavage 120°C pendant 20min

-Gélose blanche:

- Agar-agar..... 16g
- Eau distillée.....1l
- Autoclavage 120°C pendant 20min

-bouillon nutritive:

- Extrait de viande1g
- Extrait de levure.....2g
- Peptone.....5g
- Chlorure de soduim.....5g
- Eau distillée1000ml
- pH=7,4. Autoclavage 120°C pendant 20min

-Le lait de SHERMAN (Bourgeois et Leveau, 1991):

- Lait écrémé.....10ml
- Extrait de levure.....0,5 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH=6,8

Pour obtenir un lait à 0,1% de bleu de méthylène, on ajoute au moment de l'emploi 1ml de bleu de méthylène à 1% déjà stérilisé à 120°C pendant 20min. Et pour avoir un lait à 0,3% de bleu de méthylène, on ajoute au moment de l'emploi 1ml de bleu de méthylène à 3%.Selle billiare.