



UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS-
MOSTAGANEM
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté par

BEKADDOURI KHEIRA LOUISA et BELAYACHI ASMAA

Pour l'obtention du diplôme de

M A S T E R E N MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE

Spécialité : Microbiologie fondamentale.

**Isolement et Identification des bactéries
lactiques à partir de blé fermenté type
« HAMMOUM »**

Soutenue le

DEVANT LE JURY

Président	NEBBACHE S	MCB
Examineur	CHAALEL A	MCA
Encadreur	BENBOUZIANE B	MCA
Co encadreur	BENTAHAR M-C	Doctorant

*Thème réalisé au laboratoire microbiologie n°3 est au laboratoire biochimie n°1 Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie*

2019/2020

REMERCIEMENT

Avant toute chose, nous tenant à exprimer notre grand remerciement et notre profonde gratitude et reconnaissance à Allah tout puissant, qui nous a donné la force le courage, et la volonté pour réaliser ce travail et qui était avec nous par sa miséricorde dans chaque moment et chaque instant jusqu'à l'accomplir.

Nous désirons à exprimer notre sincères reconnaissance et remerciement à notre encadreur, Mr. BENBOUZIANE B, pour avoir accepté de nous encadrer et consacré autant de temps pour nous, et surtout Mr. BENTAHAR M-C pour son suivi régulier, sa bienveillance, ses conseils et ses orientations.

Nous remercions les membres du jury qui ont bien voulu accepter de juger notre modeste travail et de nous honorer: Président: Mr. NEBBACHE S et Examineurs: Mr. CHAALÈL A.

Nous remercions également tous les membres des laboratoires pédagogiques de l'université de Abdelhamid ben badis Mostaganem, qui nous ont bien aidés pour réaliser notre étude dans des bonnes conditions.

Nous remercions tous ceux qui nous ont rendu service et qui nous ont soutenus de près ou de loin pour réaliser ce travail

Nos très spéciaux remerciements reviennent à nos Parents, et aux familles : BEKADDOURI, et BELAYACHI.

Et à tous nos amis pour leurs encouragements et leurs compréhensions.

Merci à tous !

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail réalisé grâce à l'aide d'Allah le tout puissant ; A mes chers parents pour leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études , et surtout à ma chère mère qui a autant sacrifié et patienté pour mon succès.

A mes chères sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A mes chers frères, pour leur appui et leur encouragement

A ma binôme et chère amie Assma, avec qui j'ai partagé des moments difficiles et des moments agréables le long de ce travail,

A toute ma famille et mes amies pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Une spéciale dédicace à la personne qui m'a encouragé de loin par sa patience, son soutien moral au moment où j'avais besoin d'aide , mon A.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi

BEKADDOURI K. LOUISA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à : Mes très chers parents qui m'ont beaucoup soutenu et encouragé jusqu'au bout et que dieu leur accorde une longue vie.

À mon cher mari, qui a su être présent tout le long de la réalisation de ce travail

À mon ange mon fils que dieu le garde pour moi,

À mes amies sans oublier mon Binome Louisa, à qui je souhaite plein de bonheur et de succès à leur vie.

À la mémoire de mon très cher oncle ; j'aurais tant aimé qu'il soit présent. Que Dieu ait son âme dans sa sainte miséricorde.

J'adresse aussi mes dédicaces A toute ma famille et ma belle-famille

Enfin, je m'adresse mes plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui m'ont toujours encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire

Merci à tous et à toutes

BELAYACHI ASMAA

Résumé :

Les céréales sont à la base de l'alimentation humaine. Les grains de blé fermenté « hammoum » est un blé qui a passé un long séjour dans un silo souterrain. », riche en substances biologiquement actives, ce qui lui confère un grand intérêt en termes de phytothérapie. L'objectif de ce travail est de mettre en évidence les particularités de cette matière première par une caractérisation approfondie de ses principaux métabolites, ciblés en fonction de leurs propriétés biologiques et montrées effet protecteur de certaines bactéries lactiques isolées à partir de ce blé fermenté 10 isolats ont été retenus et pré- identifiés par les méthodes phénotypiques classiques en utilisant les différents tests usuels (croissance à différentes concentrations, thermo résistance etc.).

Les études des principaux caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques de la microflore lactique du blé fermenté a été réalisée en suivant les recommandations d'études similaires. 10 isolats étaient Gram positifs, catalase négative, citrate et nitrate négatives (la plupart de formes cocci). Ces bactéries lactiques immobiles ne produisent ni l'acétoïne ni l'hydrogène sulfuré (H₂S). Ces souches sont également toutes capables de croître à 45 °C.

Mots-clés : *Bactérie lactique, hammoum, probiotique, isolement .*

Abstract :

Cereals are the basis of human nutrition. The grains of fermented wheat "hammoum" is a wheat that has spent a long time in an underground silo. », Rich in biologically active substances, which gives it great interest in terms of phytotherapy. The objective of this work is to bring out the particularities of this raw material by an in-depth characterization of its main metabolites, targeted according to their biological properties and shown to have a protective effect of certain lactic acid bacteria isolated from this fermented wheat 10 isolates have were selected and pre-identified by conventional phenotypic methods using the various usual tests (growth at different concentrations, heat resistance, etc.).

Studies of the main morphological, biochemical and physiological characters of the lactic microflora of wheat firmness were performed following recommendations from similar studies. 10 isolates were Gram positive, catalase negative, citrate and nitrate negative (most cocci forms). These immobile lactic acid bacteria do not produce acetoin or hydrogen sulfide (H₂S). These strains are also all capable of growing at 45 ° C.

Keywords: *Lactic acid bacteria, hammoum, probiotic, isolation .*

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN : acide désoxyribonucléique
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNr : acide ribonucléique ribosomique
- ATP : Adénosine triphosphate.
- ACK : acétate kinase,
- ADHE : alcool déshydrogénase.
- CO₂ : Dioxyde de carbone
- EPS : Exopolysaccharides
- FAO : Food and Agriculture Organization- Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
- h : Heure.
- H⁺ : Ion d'hydrogène.
- H₂O : Dioxyde d'hydrogène.
- H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
- HCL : Acide chlorhydrique.
- LB : Lactobacillus.
- LC: Lactococcus.
- KDa: KiloDalton
- LDH: lactate déshydrogénase,
- MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass Spectrometry
- Min : Minute.
- MI : millilitres
- Mol : mole.
- MRS: Man, Rogosa et Sharpe
- MRSc: MRS Modifier (MRS+ Carbonate de Calcium)
- MRScys: MRS Modifier (MRS+Cysteine)
- NaCl : chlorure de sodium.
- NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide.
- NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit.
- Nit : Nitrate réductase.

- PBS :(Phosphate Buffered Saline)
- PBS+P: Pbs Modifier (PBS+Peptone)
- PDH : pyruvate déshydrogénase,
- PFL : pyruvate formiate lyase,
- pH : Potentiel hydrogène.
- PTA : phosphotransacétylase,
- RM : rouge de méthyl
- T° : temperature
- TSI : triple Sugar iron.
- VP : Vogues Proskauer
- % : pourcentage.
- °C : degré Celsius.
- μm : Micromètre.
- pH :Potentiel hydrogène.
- T :Température.

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: RECAPITULATIF DES TESTS BIOCHIMIQUE

33

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 COUPE LONGITUDINALE D'UN GRAIN DE BLE (POMERANZ, 1987).	4
FIGURE 2 FORME D'UNE MATMORA (BARTALI, 1987)	5
FIGURE 3 ARBRE PHYLOGENETIQUE CONSENSUS, BASE SUR LA COMPARAISON DE SEQUENCE D'ARNR 16S, MONTRANT LES PRINCIPAUX GROUPES DE BACTERIES LACTIQUES, AYANT UN FAIBLE CONTENU MOL% DEG+C DE L'ADN AINSI QUE LES BACTERIES GRAM POSITIVE NON RELIEES DES GENRES BIFID	9
FIGURE 4 : <i>LACTOBACILLUS CASEI</i> AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE (CORRIEU & LUQUET, 2008).	10
FIGURE 5 : <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> , AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE (CORRIEU ET LUQUET, 2008).	11
FIGURE 6 : <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i> , AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE (CORRIEU ET LUQUET, 2008).	12
FIGURE 7 : <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE (WALLACE ET AL, 2003).	13
FIGURE 8 : <i>LEUCONOSTOC MESAENTEROÏDES</i> AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE. (WALLACE ET AL., 2003)	14
FIGURE 9 : <i>PEDIOCOCCUS</i> AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE. (WALLACE ET AL., 2003)	15
FIGURE 10 : <i>BIFIDOBACTERIUM SP</i> (WALLACE ET AL., 2003)	16
FIGURE 11 D : IFFERENTS TYPES DE FERMENTATION (AXELSSON, 2004)	17
FIGURE 12 : SCHEMA DE LA FERMENTATION DES ACIDES MIXTES (COCAIGN — BOUSQUET ET AL., 1996)	18
FIGURE 13 : ISOLEMENT DES BACTERIES LACTIQUES A PARTIR DE BFH SUR GELOSE MRSCC ET REPIQUAGE SUR BOUILLON LAPTG ET GELOSE MRS+ CYSTEINE	28
FIGURE 14 : RESULTATS TEST CITRATE DE SIMON	33
FIGURE 15 : RESULTATS TEST NITRATE + CONFIRMATION ZINC	34
FIGURE 16 : RESULTATS TEST REACTION DE VOGES-PROSKAUER	34
FIGURE 17 : RESULTATS TEST ROUGE DE METHYL	34
FIGURE 18 : RESULTATS TEST TSI	35
FIGURE 19 : RESULTATS TEST MANNITOL MOBILITE	35
FIGURE 20 : RESULTATS DU TEST DE CROISSANCE A 45°C	35
FIGURE 21 : RESULTATS DU TEST DE CROISSANCE A 37 °C	36
FIGURE 22 : RESULTATS DU TEST DE CROISSANCE A 7°C	36

TABLE DES MATIERES

RESUME :	4
ABSTRACT :	5
LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES TABLEAUX	1
LISTE DES FIGURES	1
INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
CHAPITRE 1 :	3
1.1. Généralité : (blé)	3
1.2. STRUCTURE	3
1.3. Historique :	4
1.4. Stockage du blé :	4
1.4.1. Système de stockage traditionnelle « MATMOURAS » :	4
1.4.2. Stockage moderne :	5
1.5. Transformation du blé :	6
1.6. Les variétés du blé	6
1.6.1. Variété du blé dur en Algérie	6
1.6.2. La variété mondiale du blé	6
CHAPITRE 2 :	7
2. Les bactéries lactiques	7
2.1 Définition et caractéristiques des bactéries lactiques	7
2.2 Classification des bactéries lactiques	8
2.3 Caractéristiques des principaux genres de bactéries lactiques	9
2.3.1 . Genre <i>Lactobacillus</i>	9

2.3.1.1	Groupe I « Thermobacterium »	10
2.3.1.2	Groupe II « Streptobacterium »	10
2.3.1.3	Groupe III « Betabacterium » :	10
2.3.2	Genre Lactococcus	11
2.3.3	Genre <i>Streptococcus</i>	11
2.3.4	Genre <i>Enterococcus</i>	12
2.3.5	Genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	13
2.3.6	Genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	14
2.3.7	Genre <i>Bifidobacterium</i>	15
2.4	Métabolisme des bactéries lactiques	16
2.4.1	. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques	16
2.4.2	. Voie homofermentaire ou EM	17
2.4.3	. Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate	18
2.4.4	Voie bifide ou FPC [Fructose 6 —phospho —cétolase]	18
2.5	Intérêts des bactéries lactiques	19
2.5.1	Dans la biopréservation	19
2.5.2	Dans l'industrie alimentaire	19
2.6	Les activités antimicrobiennes des bactéries lactiques	19
2.6.1	Les acides organiques	19
2.6.2	Le peroxyde d'hydrogène	20
2.6.3	Le dioxyde de carbone	20
2.6.4	Le diacétyle	20
2.6.5	La reutéline	20
2.6.6	Les bactériocines	21

CHAPITRE 3 : 22

3.1. Bactériocines :	22
3.1.1. Définition des bactériocines :	22
3.1.2. Rôle des bactériocines	22
3.1.3. Variabilité des bactériocines	22
3.1.4. Classification des Bactériocines	22
3.1.4.1. Classe I : Les lantibiotiques	22
3.1.4.2. Classe II	23
3.1.4.3. Classe III	23
3.1.4.4. Classe IV	23
3.1.5. Les facteurs influençant la production de bactériocines	23
3.2. Exopolysaccharides :	23
3.2.1. Définition des exopolysaccharides	23
3.2.2. Rôle physiologique de la production d'exopolysaccharides	24
3.2.3. Variabilité de la production d'exopolysaccharides	24
3.2.4. Structure moléculaire des exopolysaccharides	24
3.2.5. Facteurs influençant la production d'exopolysaccharides	24

MATERIELS ET METHODES 3

1. OBJECTIF	25
2. LIEU DE TRAVAIL	25
3. Origine et échantillonnage du blé fermenté :	25
4. Milieux de culture et conditions de croissance	25
5. Matériels	25
5.1 Appareillage	26
5.2 Petits matériels	26
6. Méthodologie:	26
6.1 Isolement, pré identification et conservation des isolats :	26
6.1.1 Suspension mère et dilutions décimales :	27
6.2 – Purification et pré-identification des isolats et leur appartenance au groupe lactique	27
6.3 Conservations des bactéries lactiques :	28
6.4 Identification des isolats	28
6.4.1 Morphologique	29
6.4.1.1 Caractérisation macroscopique	29
6.4.1.2 Caractérisation microscopique	29
6.4.1.3 Coloration de Gram	29
6.4.1.3.1 Principe :	29
6.4.1.4 Recherche de la catalase :	30
6.4.2 Tests Biochimiques :	30
6.4.2.1 Recherche du nitrate-réductase :	30
6.4.2.2 Test Mannitol-Mobilité :	30
6.4.2.3 Test Citrate de Simmons	30
6.4.2.4 Test de production d'acétoïne (VP/RM)	31
6.4.2.5 Test d'utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron (TSI) :	31
6.4.2.6 Test de croissance à différentes températures	31
RESULTATS	33
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE	37
ANNEXE I : LES MILIEUX DE CULTURES ET REACTIFS	37
ANNEXE II : COLORATION DE GRAM	41

Introduction

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

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base des aliments naturels sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il est difficile de définir les molécules responsables de l'action thérapeutique et curative (Bahorun, 1997). Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques (Bérubé-Gagnon, 2006).

Comme les propriétés antimicrobiennes, anti-oxydante des extraits récupèrent de quelques aliments sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (Yano *et al.*, 2006). Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives (Ferrari, 2002).

Les céréales sont à la base de l'alimentation humaine (Multon, 1982 ; Molinié et Pfohl-Leszhawicz, 2003) ; qui peuvent nous apporter des phytonutriments importants pour la santé humaine (Doumandjiet *al.*, 2003). Pour le besoin de la présente étude, nous avons choisi un blé dur de type fermenté « Hamoum » parmi les aliments qui sont les moins fréquemment employés dans notre pays à cause de l'ignorance des gens, mais qui sont utilisés traditionnellement contre plusieurs maladies notamment les diabètes, ballonnement, et récemment soulignent des propriétés curatives contre les cancers ; puisque le traitement chimique développe des effets secondaires néfastes sur la santé, le retour à la nature devient plus en plus demandé. La fabrication traditionnelle de « Hamoum » et sa maturation sont des processus impliquant une multitude d'événements biochimiques complexes, principalement dirigés par les micro-organismes.

Les bactéries lactiques sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Axelsson, 2004). Où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques (Boucher et Moineau, 2001). Outre, ces micro-organismes peuvent être utilisés dans les produits non fermentés comme des cultures protectrices. Cette utilisation est due aux effets nutritionnels et thérapeutiques (Rodgers, 2003 ; Vermeiren *et al.*, 2004 ; Georges, 2008).

Notre travail aborde plusieurs aspects liés à une étude *in vitro* qui consiste à étudier l'activité biologique d'un type de blé fermenté naturellement qui est le Hamoum, isolement et identification des bactéries lactiques.

- Le manuscrit de la thèse comprend trois chapitres avec une introduction

- Le premier et le second chapitre comprennent une synthèse bibliographique sur le statut des céréales et du blé fermenté en particulier, sur les bactéries lactiques avec les caractéristiques et les intérêts qui s'y rapportent.
- Le troisième chapitre comprend les activités microbiennes des bactéries lactiques (Bactériocines et Exo-polysaccharides).
- Le quatrième chapitre consacré au matériel et méthode présente l'origine du matériel biologique et décrit avec précision tous les protocoles expérimentaux.
- Le cinquième chapitre comprend les références bibliographiques et les annexes.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 :

1.1. GENERALITE : (BLE)

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

Les céréales sont un groupe des plantes annuelles cultivées, appartenant à la famille des *Poaceae* (Guignard et Dupont, 2004). Cette famille, parmi toutes celles du règne végétal, occupe une place à part, non seulement par le nombre de ses espèces, mais encore son ubiquité, sa répartition et son intérêt humain, historique comme économique (Mosiniaket *al.* 2001 ; Alais *et al.* 2003 ; Guignard et Dupont, 2004). Les espèces qui dominent aujourd'hui la production du blé sont : le blé tendre et le blé dur.ils se différencient par la friabilité de l'amande. L'amande du blé tendre est blanche et friable, tandis que celle du blé dur est jaune et plus dure (Feillet, 2000 ; Jeantet *et al.* 2007).

Le grain de blé se présente sous la forme d'un corps ovoïde dont les deux extrémités sont inégales, et qui offre sur l'une de ses faces un sillon. Sur la face dorsale de l'une des extrémités se trouve une légère dépression. Les membranes qui recouvrent le grain en ce point sont plus fines, plus blanches et plissées. Cette dépression, qui est plus ou moins étendue suivant les variétés de blé, correspond à l'embryon. À l'autre extrémité du grain se trouvent des poils plus ou moins nombreux et plus ou moins longs. Ces poils constituent la brosse (Kermiche, 2013).

1.2. STRUCTURE

Le grain de blé est formé de trois parties distinctes : les enveloppes, l'albumen, et le germe (Smith et Hui, 2004).

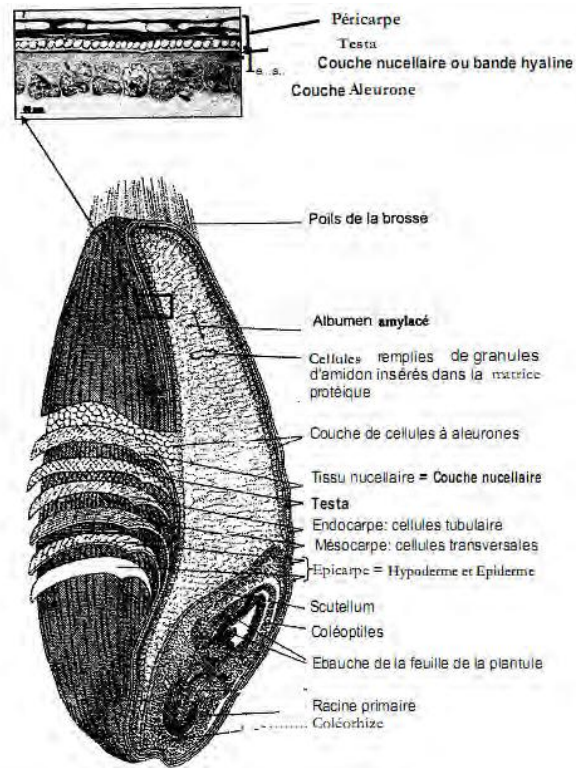


Figure 1 Coupe longitudinale d'un grain de blé (Pomeranz, 1987).

1.3. HISTORIQUE :

La culture des céréales a permis l'essor des grandes civilisations, car elle a constitué l'une des premières activités agricoles. En effet, il y a plus de trois millions d'années, l'homme préhistorique était nomade, pratiquait la chasse et la cueillette des fruits pour assurer sa nourriture. Le nomadisme a progressivement laissé la place à la sédentarité qui permit la culture des céréales. Le blé est l'une de ces céréales connues depuis l'antiquité (Harian, 1975 ; Ruel, 2006). Sa culture remontée au mésolithique vers 7000 avant Jésus-Christ (Anonyme1, 1981 ; Ruel, 2006).

1.4. STOCKAGE DU BLE :

À travers l'histoire, le stockage des grains des blés a fourni à des humains un amortisseur contre l'échec et la famine de récolté (Druvefors, 2004).

1.4.1. Système de stockage traditionnelle « MATMOURAS » :

L'homme fait des efforts pour améliorer les conditions de stockage depuis MATMORAS jusqu'aux silos modernes (Mokhtari, 2007). Les entrepôts souterrains destinés au stockage des grains est une pratique traditionnelle, très ancienne et largement utilisée dans certaines régions. Ce mode de stockage est utilisé dans plusieurs pays de l'Afrique, au Proche Orient, en Asie et en Algérie, le paysan algérien, sur les Hautes plateaux, conservait le produit de ses champs de blé (Kermiche M, 2013). Cette technique de stockage des céréales est appelée « Matmora ». Elle consiste à enfouir le produit dans le sol dans une cavité d'une capacité

moyenne de 5 tonnes environ. La "Matmora" présente une forme cylindricoconique, cylindrique, sphérique ou amphorique (FAO, 1994 ; Bartaliet *al.*, 1989). Généralement à un endroit surélevé ou proche de la ferme. La capacité de ces lieux de stockage est variable (Mokhtari, 2007). Pour la construction et la protection du grain stocké contre les fluctuations de température extérieure (Mokhtari, 2007). Cependant ce type de stockage est parfois responsable de la fermentation des grains subit avec le temps une fermentation spécifique en raison de la composition biochimique du grain d'une part et d'autre part des conditions climatiques et la nature de matériaux utilisés pour la confection du MATMOURA.

La fermentation peut durer 4-9 ans. L'humidité constitue un facteur important pour le développement de certaines bactéries responsables de la fermentation des grains. La température, lorsqu'elle est assez élevée, peut favoriser la prolifération des microorganismes présents dans la masse des céréales. L'augmentation de la température peut être d'origine biologique ou climatique. L'échange de la chaleur entre le stock et le milieu extérieur se fait à travers les parois et les ouvertures (Kermiche, 2013). L'inconvénient majeur de cette méthode de stockage est la trop forte humidité et les eaux d'infiltration qui favorisent le développement des microorganismes et les phénomènes de fermentation bactérienne (Doumandjiet *al.* 2003).

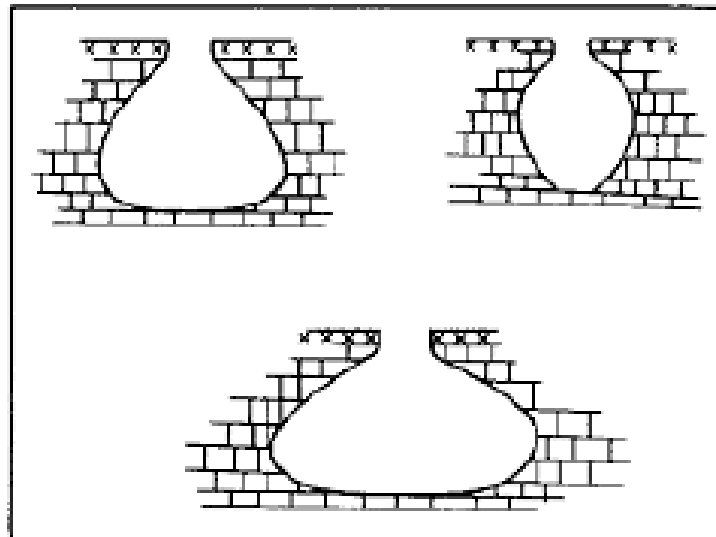


Figure 2 Forme d'une matmora (Bartali, 1987)

1.4.2. Stockage moderne :

Les modalités techniques ont varié avec les époques et lieux. Les enjeux sont toujours restés les mêmes et l'évolution technique a surtout permis une augmentation des capacités de stockage et une accélération des échanges. De nos jours les silos modernes permettent de stocker plusieurs types de céréales en même temps (Doumandjiet *al.* 2003).

Le hamoum, issu du blé fermenté est utilisé dans la préparation de pain de blé fermenté et de couscous lemziet, elmachroub. Ces derniers sont caractérisés par une variété de saveur, de texture et d'arômes particuliers pour les consommateurs des régions spécifiques (Bekhoucheet *al.*, 2013).

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

1.5. TRANSFORMATION DU BLE :

On distingue deux espèces de blé : le blé tendre et le blé dur. Ces deux espèces se différencient par la friabilité de l'amande. L'amande du blé tendre est blanche et friable, tandis que celle du blé dur est jaune et plus dure (Feillet, 2000 ; Jeantet *et al.* 2007).

Au moulin, les graines de blé tendre sont broyées en farine, celles-ci servent à la fabrication de pains, de biscuits, de pâtisseries, de pizzas, de viennoiseries. À la semoulerie, les grains de blé dur sont broyés en semoules, ceux-ci servent à la fabrication de pâtes et de couscous c'est la transformation des graines (Nedjah, 2015).

1.6. LES VARIETES DU BLE

1.6.1. Variété du blé dur en Algérie

Les blés cultivés en Algérie appartiennent pour la presque totalité aux espèces *T. aestivum L.* (blé tendre) et *T. durum Desf.* (blé dur). À l'intérieur de chaque espèce, on trouve de nombreuses variétés botaniques. En effet, la diversité des blés algériens a été à l'origine, étudiée à partir des caractères morphologiques. D'autres paramètres tels que la taille, la forme de l'épi, la position des barbes (Selmi, 2000 ; Ait-Slimane et Ait-Kaki, 2008).

1.6.2. La variété mondiale du blé

Les résultats d'expériences d'hybridation ont montré que les génomes des graminées peuvent souvent être regroupés en deux types distincts. Chaque type a reçu un nom A, B ou D (Ferret, 1996 ; Selmi, 2000 ; Ait-Slimane et Ait-Kaki, 2008).

Chapitre 2 :

2. LES BACTERIES LACTIQUES

2.1 Définition et caractéristiques des bactéries lactiques

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

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

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

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

Dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromage). Les différentes espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis* et/ou *Lactococcus garvieae*, les plus rencontrés dans le lait et le fromage sont communément utilisés comme ferments (« starter culture ») par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers. Elles sont à l'origine de la fermentation pour la préparation de nombreuses boissons à partir de plantes (boza, cidre), céréales (maïs, sorgho). Acido-tolérant, les bactéries lactiques sont capables de survivre dans des milieux très acides en raison de leur production d'acide lactique. De plus, l'acidification du milieu participe à l'inhibition de la croissance de certains microorganismes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes* (Ennaharet *al.*, 1998).

2.2 Classification des bactéries lactiques

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

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

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

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

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

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

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

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

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

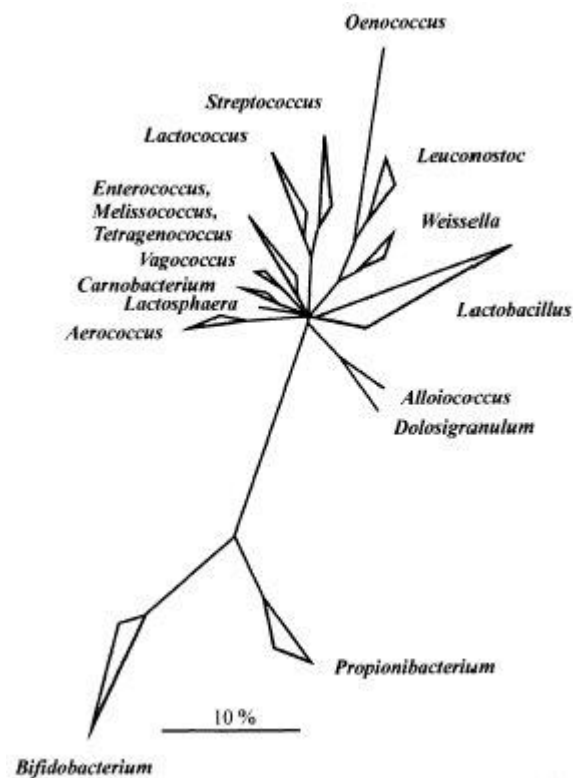


Figure 3 Arbre phylogénétique consensus, basé sur la comparaison de séquence d'ARNr 16S, montrant les principaux groupes de bactéries lactiques, ayant un faible contenu mol% de G+C de l'ADN ainsi que les bactéries Gram positive non liées des genres *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfel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

2.3 Caractéristiques des principaux genres de bactéries lactiques

2.3.1 . Genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* a été proposé par Beijerinck en 1901. Il compte à ce jour plus de cent espèces, largement répandues dans les règnes animaux et végétales. Elles sont caractérisées par leur hétérogénéité : le pourcentage GC varie de 32 à 53 %. De par leur variété, elles sont présentes dans des milieux très différents : laits fermentés comme le kéfir, végétaux fermentés comme la choucroute, les viandes fraîches ou fermentées, l'ensilage ou le vin, le tube digestif de l'homme et des animaux (Guiraud, 2003 ; Galvez *et al.*, 2008). Ces bactéries ont une forme de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, généralement

immobiles, asporulées, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth., 1990 ; Leclerc *et al.*, 1994).

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

2.3.1.1 Groupe I « *Thermobacterium* »

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

2.3.1.2 Groupe II « *Streptobacterium* »

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

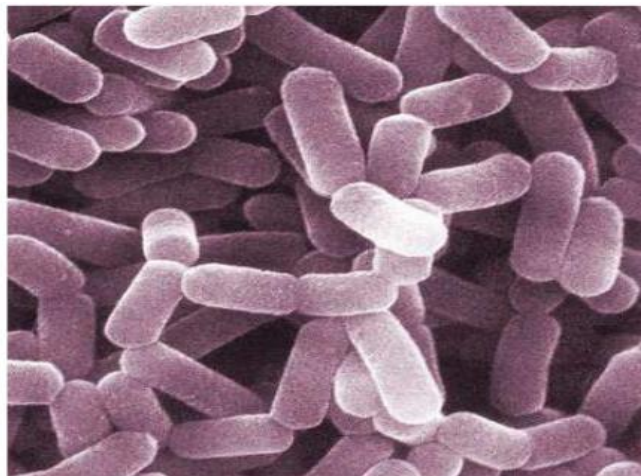


Figure 4 : *Lactobacillus casei* au microscope électronique (Corrieu & Luquet, 2008).

2.3.1.3 Groupe III « *Betabacterium* » :

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

2.3.2 Genre *Lactococcus*

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

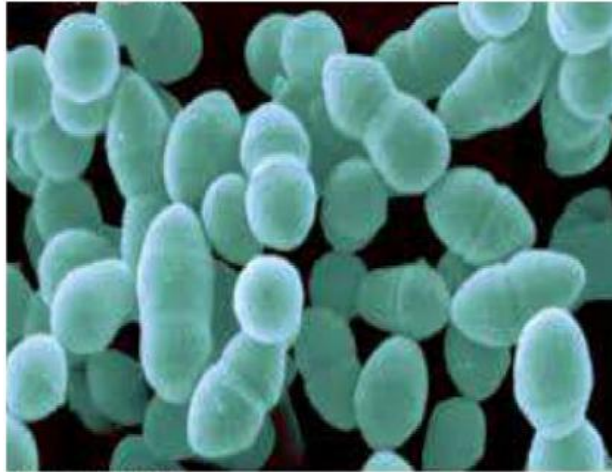


Figure 5 *Lactococcus lactis*, au microscope électronique (Corrieu et Luquet, 2008).

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

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

2.3.3 Genre *Streptococcus*

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

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

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

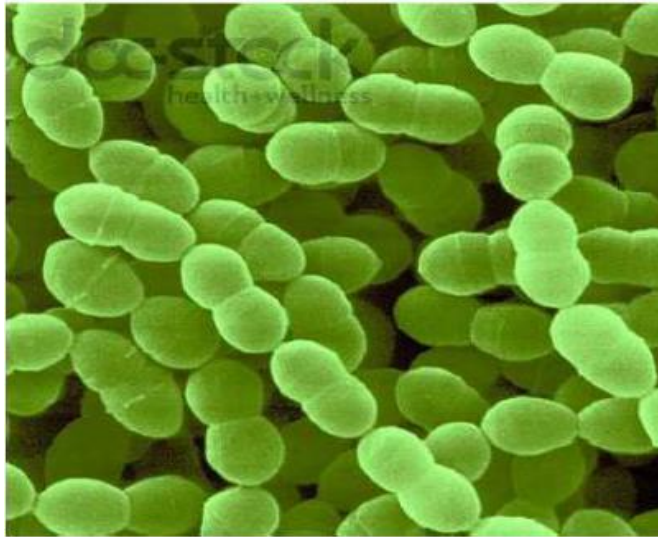


Figure 6 *Streptococcus thermophilus*, au microscope électronique (Corrieu et Luquet, 2008).

L'espèce *Streptococcus thermophilus* (Figure 6), largement présente dans le lait et les produits laitiers comme agent d'acidification, possède le statut GRAS. Cette espèce se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène.

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

2.3.4 Genre *Enterococcus*

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

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



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

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

2.3.5 Genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*

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

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

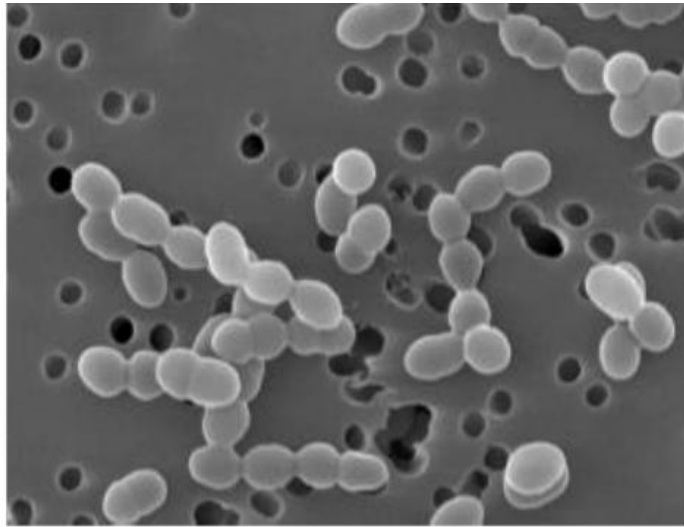


Figure 8 *Leuconostoc mesenteroides* au microscope électronique. (Wallace et al., 2003)

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

2.3.6 Genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus*

Le genre *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade (Figure 9). Ils sont mésophiles, le plus souvent incapable d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance (Simpson et Taguchi, 1995). Les bactéries appartenant à ce genre productrices de bactériocines ne sont pas adaptées à la fabrication des produits laitiers fermentés de par leur manque ou leur lenteur de fermentation du lactose (Papagianni et Anastasiadou, 2009). En revanche, la souche *Pediococcus acidilactici* productrice de pédiocine PA—1/AcH s'est révélée être responsable de la bonne conservation de la viande en diminuant les populations de *Listeria monocytogenes* et de *Clostridium perfringens* (Rodriguez et al., 2002). Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18 % de NaCl (Pilet et al., 2005).

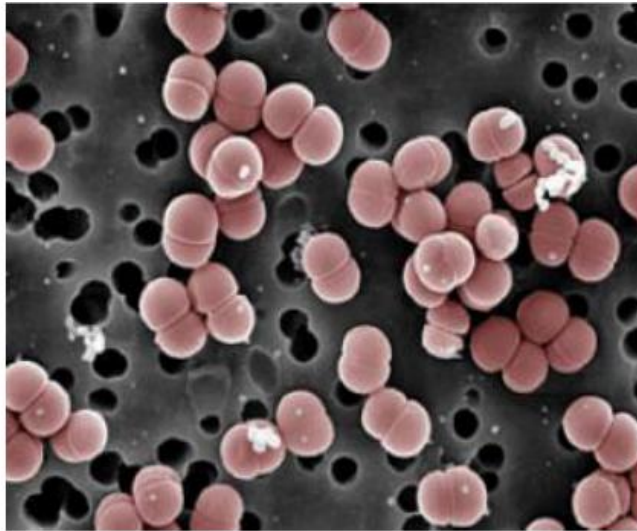


Figure 9 *Pediococcus* au microscope électronique. (Wallace *et al.*, 2003)

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

2.3.7 Genre *Bifidobacterium*

Traditionnellement, le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu G+C > mol 50 % et affecté au phylum des *Actinobacteria* (Gomez et Malcata, 1999 ; Leahy *et al.*, 2005). Néanmoins, les bifidobactéries sont également considérées comme des bactéries lactiques, en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables et du fait qu'elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques tel que le tractus gastro-intestinal (Klein *et al.*, 1998). En effet, elles ont généralement un pH optimal de croissance autour de 6,5 à 7 et une température de croissance comprise entre 37 °C et 41 °C. Elles ont la forme irrégulière d'un V ou une morphologie bifide en forme de Y (Figure 10). Elles sont hétérofermentaires et dégradent les hexoses en produisant de l'acide lactique et acétique (Gomez et Malcata, 1999 ; Leahy *et al.*, 2005).



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

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

2.4 Métabolisme des bactéries lactiques

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

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

2.4.1 . Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

- La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (Atlan et al., 2008) :
- Le transport du sucre à travers la membrane cellulaire ;
- Le catabolisme intracellulaire du sucre ;
- Formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

Pour pénétrer dans la cellule, les sucres doivent d'abord franchir la membrane cellulaire qui possède une perméabilité sélective : elle laisse passer les composés apolaires par diffusion mais se révèle imperméable aux composés polaires hydratés. Deux systèmes de transport actifs des sucres sont présents chez les bactéries lactiques : le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS), qui couple le transport et la phosphorylation du glucide (phosphorylation en cascade), et le système perméase énergie-dépendant, qui fait pénétrer les glucides sous forme de sucres libres (Thompson, 1987).

Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (Figure 9). Il s'agit des voies homofermentaire (Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) (Atlan *et al.*, 2008).

2.4.2 . Voie homofermentaire ou EM

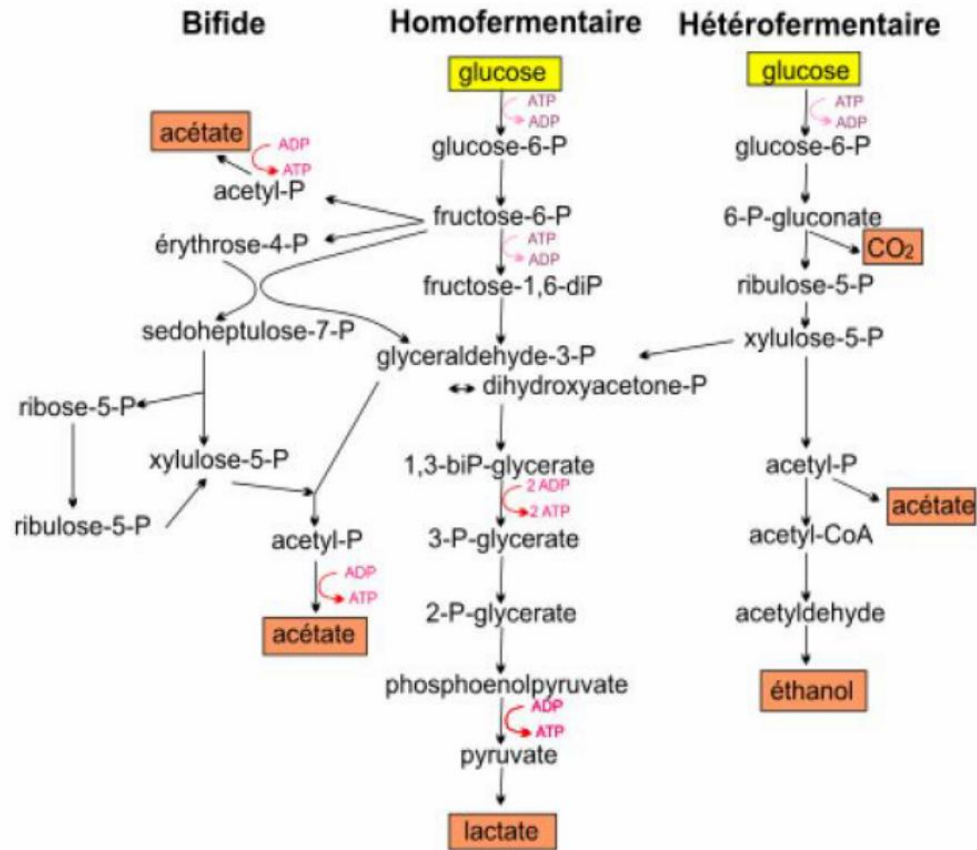


Figure 11 Différents types de fermentation (Axelsson, 2004)

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

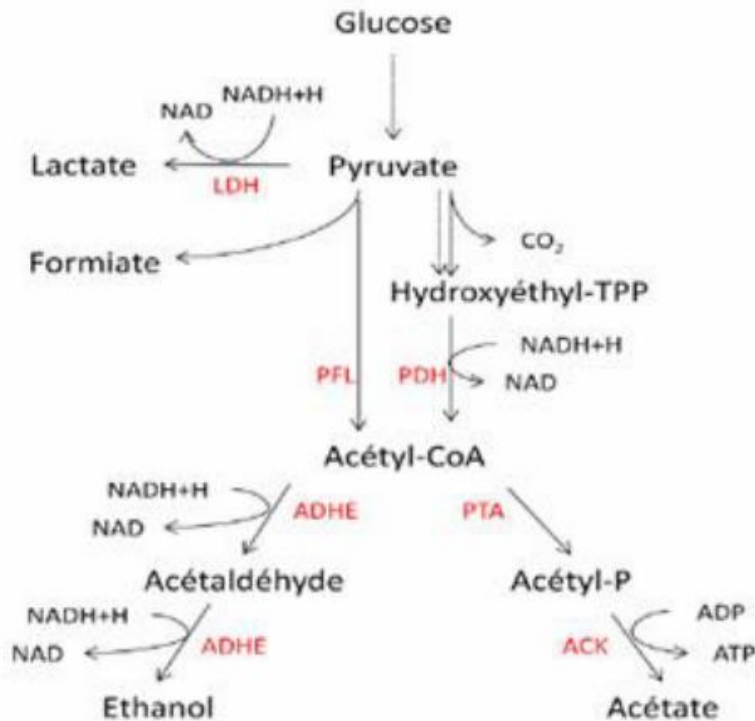


Figure 12 Schéma de la fermentation des acides mixtes (Cocaign — Bousquet et al., 1996)

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

2.4.3 . Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphate

Les principaux groupes de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les *Leuconostoc*elles que *Leuconostocmesenteroides*(*Ln. mesenteroides*) et *Leuconostocpentosaceus* et certains *Lactobacillus* tels que *Lactobacillusbrevis*, *Lactobacillusfermenti*. Ce groupe de bactéries dégrade les hexoses en empruntant la voie hétérofermentaire communément appelée voie des pentoses phosphate (Figure9) qui conduit à la formation d'une molécule d'acide lactique, d'une molécule d'éthanol et d'une molécule de CO₂ (Kandler, 1983). Les sucres à cinq atomes de carbone ou pentoses, comme le fructose, peuvent parfois être fermentés et donnent alors une molécule d'éthanol et une molécule d'acide lactique. Outre ces produits, qui représentent plus de 80 % des métabolites obtenus, on obtient également de l'acide acétique et du glycérol.

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

2.4.4 Voie bifide ou FPC [Fructose 6 —phospho —cétolase]

Cette voie est empruntée par les bactéries du genre *Bifidobacterium*, elle permet d'avoir 1,5 molécules d'acétate et 2,5 molécules d'ATP à partir d'une molécule d'hexose consommée. (Figure 9).

2.5 Intérêts des bactéries lactiques

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

2.5.1 Dans la biopréservation

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

2.5.2 Dans l'industrie alimentaire

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

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

2.6 Les activités antimicrobiennes des bactéries lactiques

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

2.6.1 Les acides organiques

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

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

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

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

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

2.6.2 Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques ne possèdent généralement pas de catalase. L'accumulation du peroxyde d'hydrogène sous l'action des oxydases est la cause majeure de la présence de l'activité antimicrobienne, notamment chez les lactobacilles (Daeschel, 1989). L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène est principalement due à son fort effet oxydant sur les lipides membranaires et les protéines cellulaires (Caplice et Fitzgerald, 1999).

2.6.3 Le dioxyde de carbone

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

2.6.4 Le diacétyl

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

2.6.5 La reutérine

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

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

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

2.6.6 Les bactériocines

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

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

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

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

Chapitre3 :

3.1. BACTERIOCINES :

3.1.1. Définition des bactériocines :

Les bactériocines sont considérées comme des substances protéiques présentant une activité antimicrobienne. Ainsi les bactériocines, peuvent être isolées chez de nombreuses bactéries et archées (Klaenhammer, 1988). Aujourd'hui, les bactériocines désignent le plus souvent des protéines ou complexes de protéines produits par les bactéries Gram positif et plus particulièrement les bactéries lactiques (Klaenhammer 1988). Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens le plus souvent cationiques, modifiés ou non post-traductionnellement, de masses moléculaires comprises entre 2 et 6 kDa (Heng *et al.*, 2007a).

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

3.1.2. Rôle des bactériocines

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

3.1.3. Variabilité des bactériocines

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

3.1.4. Classification des Bactériocines

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

3.1.4.1. Classe I : Les lantibiotiques

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

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

3.1.4.2. Classe II

Cette classe regroupe les peptides dont le poids moléculaire est inférieur à 10 kDa, sont stables à la chaleur et dépourvues de lantionine. Ces bactériocines ne contiennent pas d'acides aminés modifiés. Cette classe est divisée en quatre sous-classes. (Tahlaiti, 2018)

3.1.4.3. Classe III

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

3.1.4.4. Classe IV

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

Les bactériocines sont produites à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance (Dortu ;Thonart., 2009). Elles peuvent être dégradées par les protéases produites par les bactéries lactiques productrices (Savijokiet *al.*, 2006) ou être adsorbées à sa surface, ce qui mène à la baisse de la concentration de bactériocines dans la culture.

3.1.5. Les facteurs influençant la production de bactériocines

Ils sont principalement la souche productrice, la température, le pH, la composition du milieu et la technologie de fermentation employée (Dortu, 2008).

3.2. EXOPOLYSACCHARIDES :

3.2.1. Définition des exopolysaccharides

Les EPS sont des polysaccharides d'origine microbienne constitués de longues chaînes d'unités répétitives de sucres simples et/ou de dérivés de glucides plus ou moins ramifiées (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a). Les EPS produits par les bactéries lactiques peuvent être attachés à la membrane bactérienne (EPS capsulaires) ou sécrétés directement dans le milieu (EPS libres) (Bouzaret *al.*, 1997 ; Hess *et al.*, 1997). Certaines bactéries peuvent produire à la fois des EPS libres et capsulaires (Hassan, 2008). Les EPS ont l'avantage d'être « naturels », requis en faible concentration (de l'ordre de mg/L) et de pouvoir remplacer les agents stabilisants par leurs propriétés de modifier positivement la texture, la viscosité et la sensation en bouche des laits fermentés (Marshall ; Rawson, 1999).

3.2.2. Rôle physiologique de la production d'exopolysaccharides

Bien que le rôle physiologique de la production des EPS demeure inconnu, plusieurs hypothèses ont été émises. Les EPS contribueraient à protéger les bactéries contre les environnements hostiles et/ou toxiques, la séquestration de certains cations essentiels et la reconnaissance cellulaire (Broadbent *et al.*, 2003). Les EPS pourraient également aider à la compétition contre les colonies envahissantes. Les EPS capsulaires possèderaient également une autre fonction ; soit de protéger les bactéries lactiques contre l'attaque des bactériophages (Broadbent *et al.*, 2003).

3.2.3. Variabilité de la production d'exopolysaccharides

Généralement pour les bactéries thermophiles, la production d'EPS est associée à la croissance bactérienne (Petry *et al.*, 2003 ; Degeest ; De Vuyst, 1999 ; De Vuyst *et al.*, 1998). Plusieurs auteurs ont noté une instabilité dans la production d'EPS (Degeest ; De Vuyst, 1999 ; Cerninget *al.*, 1992 ; Cerninget *al.*, 1988 ; Macura ; Townsley, 1984). Cette production instable d'EPS pourrait s'expliquer par des repiquages successifs de souches (Cerninget *al.*, 1990), la dégradation possible des EPS durant l'entreposage par des glycohydrolases extracellulaires (Petry *et al.*, 2003 ; Degeest ; De Vuyst, 1999 ; Cerninget *al.*, 1988 ; Macura ; Townsley, 1984) ou une instabilité génétique comme la perte du gène de production d'EPS (Jolly ; Stingele, 2001).

3.2.4. Structure moléculaire des exopolysaccharides

Les EPS produits par les bactéries lactiques sont divisés en deux groupes : les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a ; De Vuyst *et al.*, 2001). Pour le premier groupe, l'EPS est constitué d'un seul type de monosaccharides tandis que les EPS du second contiennent une séquence répétée de deux ou plusieurs sucres simples (Vaningelgemet *al.*, 2004a ; Duboc ; Mollet, 2001 ; De Vuyst *et al.*, 2001). Les homopolysaccharides sont composés soit de glucose (α -D-glucans ou — Dglucans), soit de fructose (fructans) ou soit de polygalactane sous forme pyranose ou furanose (Ruas-Madiedo ; de los Reyes-Gavilan, 2005 ; Monsanet *al.*, 2001).

Les deux positions (alpha ou beta) du groupement hydroxyle sur l'hexose sont possibles (De Vuyst *et al.*, 2001). Les homopolysaccharides possèdent un poids moléculaire élevé soit de 2,7 à 21,6 X 106 Dalton (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a).

3.2.5. Facteurs influençant la production d'exopolysaccharides

La production d'EPS oscille entre 40 et 400 mg/L (Amatayakul, 2005). La quantité d'EPS produit et leurs caractéristiques structurales dépendent de la souche et de l'espèce ainsi que des conditions environnementales utilisées telles que le milieu de culture, la température et la durée d'incubation, la vitesse d'acidification, le pH et la quantité d'oxygène (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002a ; De Vuyst ; Degeest, 1999).

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

1. OBJECTIF

Notre travail abordé est une étude :

De caractéristiques microbiologiques et biochimique du blé fermenté « Hamoum »(isolement et identification des bactéries lactiques).

2. LIEU DE TRAVAIL

L'intégralité du travail a été réalisée au laboratoire de microbiologie N° 3 et au laboratoire de biochimie N°1 département de biologie, université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

3. ORIGINE ET ECHANTILLONNAGE DU BLE FERMENTE :

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

Les grains de blé prélevé datent d'une année. Ils sont récupérés dans un emballage alimentaire et mit au froid jusqu'à utilisation. Ces grains sont de couleur gris-jaunâtre ayant une forte odeur de fermentation à cause de leur long séjour dans le silo.

4. MILIEUX DE CULTURE ET CONDITIONS DE CROISSANCE

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

- Milieu MRS Gélose modifié (milieu de Man, Rogosa et Sharpe) : mMRSc : MRS Gélose +Carbonate de Calcium,
- mMRScy : MRS Gélose+ Cystéine.
- MRS liquide : utilisé pour favoriser la culture des Bactéries lactiques.
- PBS (Phosphate Buffered Saline) et PBS+Peptone.
- LAPTG liquide.

Tous les milieux de culture utilisés dans cette étude sont stérilisés à 121 °C pendant 15mn.La composition des différents milieux de culture est présentée en annexes.

5. MATERIELS

Le matériel utilisé pour les différentes manipulations est le suivant:

5.1 Appareillage

- Autoclave
- Étuve bactériologique
- Vortex
- Balance de précision
- Bain-marie
- Bec bensen
- Agitateur magnétique chauffant
- Réfrigérateur
- Microscope optique
- pH-mètre

5.2 Petits matériels

- Boîte de Petri
- Pipette Pasteur
- Tube à Essai
- Erlen Meyer
- Flacons en verre (250 ml)
- Béchers de 500 ml
- Micropipette (200 µl)
- Anse de platine
- Mortier

6. METHODOLOGIE:

6.1 Isolement, pré identification et conservation des isolats :

L'identification des souches a été réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

6.1.1 Suspension mère et dilutions décimales :

-10 g de grains de blé fermenté « Hamoum » sont mis dans 90 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline) + peptone et incubés à 30 °C pendant 3 jours. Pour obtenir la solution mère, on écrase dans un mortier les grains de blé qui sont déjà très humides.

À partir de chaque solution mère (des produits à analyser), des dilutions décimales jusqu'à 10^{-6} sont réalisées :

- Repartir stérilement 9 ml de diluant (PBS) dans une série de tubes ;
- Agiter la solution mère pour assurer une répartition homogène des micro-organismes ;
- Prélever 1 ml de la solution à analyser et transférer dans le tube n° 1 ;
- on obtient ainsi la dilution 10^{-1} ;
- Après agitation, prélever 1 ml de la dilution 10^{-1} et transférer dans le tube n° 2 pour obtenir la dilution 10^{-2} et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de différentes dilutions (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}).
- Après homogénéisation, un volume de 0,1 ml de chaque dilution (Solution mère, 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) est étalé en surface dans des boîtes de Petri contenant les milieux MRSc.
- Les boîtes de Pétri sontensemencées et incubées en anaérobiose (à la jarre) 30 °C durant 18 à 72 h.
- Après croissance sur ces milieux, un examen microscopique est effectué après coloration de Gram. Les boîtes dont les colonies sont bien distinctes et dont les caractères culturels comme l'aspect, la taille et la couleur correspondent aux caractéristiques des bactéries lactiques sont notés. Seuls les isolats à Gram+ et catalase — sont passés par un repiquage alternatif pour être purifiés.

6.2 – Purification et pré-identification des isolats et leur appartenance au groupe lactique

La réalisation de la purification sur les bactéries sélectionnées est réalisée par un repiquage de façon alternée sur milieu LAPTg (liquide) et MRS + cystéine. Après 18 à 72 h d'incubation à 30 °C ; à chaque fois, 7 à 10 colonies représentatives bien isolées du milieu LAPTg liquide sur milieu MRS + cystéine solide et vice versa. La pureté de la souche est vérifiée par une observation microscopique ; l'aspect des colonies (couleur, taille, forme..)

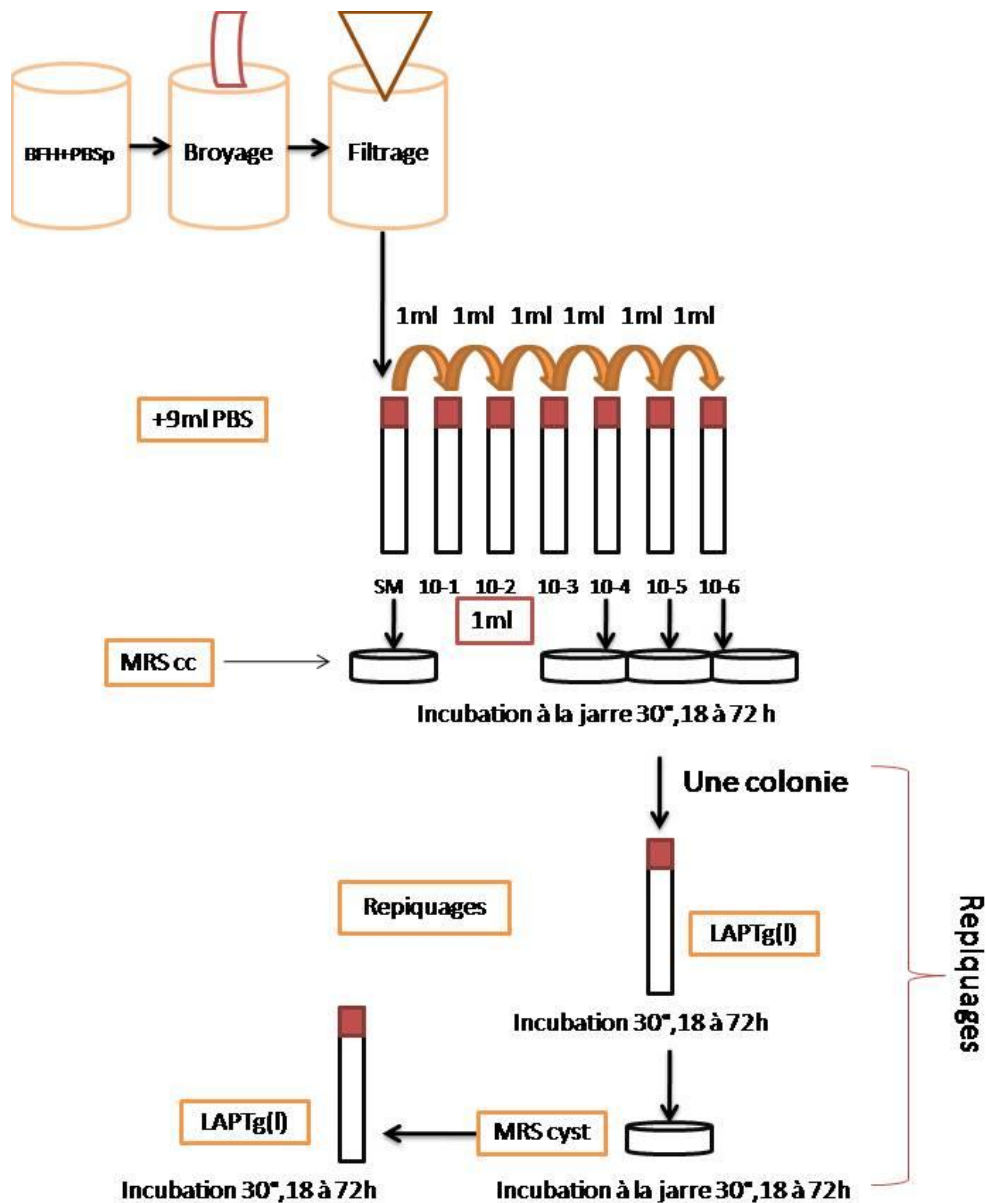


Figure 13 Isolement des bactéries lactiques à partir de BFH sur Gélose MRScc et repiquage sur bouillon LAPTg et Gélose MRS+ cystéine

6.3 Conservations des bactéries lactiques :

Après purification, les isolats sont conservés à court terme : les isolats purs sont ensemencés dans des tubes de MRS incliné. Après incubation à 30 °C, 18 h, les tubes sont placés à +6 °C et leur renouvellement se fait par repiquage toutes les 4 semaine (Devoyod et Muller, 1969).

6.4 Identification des isolats

Les analyses entamées nous permettent de classer les isolats en différents genres. Pour l'identification au niveau espèce et sous-espèces, les tests biochimiques s'avèrent nécessaires et indispensables. L'identification des isolats de bactéries lactiques a été réalisée en plusieurs étapes :

6.4.1 Morphologique

6.4.1.1 *Caractérisation macroscopique*

L'étude morphologique est portée sur l'observation macroscopique qui consiste à décrire les colonies observées sur les milieux. Cela concerne leur taille, leur couleur, leur forme, leur contour, leur viscosité, leur aspect (Badis *et al.*, 2005)..

6.4.1.2 *Caractérisation microscopique*

L'examen microscopique est représenté par le test de Gram qui permet de classer les bactéries selon leur Gram, leur morphologie cellulaire et leur mode d'association, les colonies obtenues sont observées au microscope optique après fixation d'un frottis et la coloration de Gram. Les résultats de Gram nous orientent vers les démarches à suivre pour les autres tests (Larpen *et al.*, 1990 ; Ventura & Zink, 2002).

Technique de préparation des frottis :

- o Déposer sur une lame propre une goutte d'eau stérile si la culture prélevée est solide, puis prélever à l'aide de l'anse de platine une parcelle de la culture.

- o Mélanger afin d'obtenir une suspension homogène.

- o Réaliser le frottis en partant du centre de la lame, en décrivant avec l'anse des mouvements circulaires de façon à obtenir un étalement mince et homogène sur au moins 2/3 de la lame.

- o Sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme du bec Bunsen sans trop le chauffer

- o Une fois sec, passer dans la flamme le frottis 3 ou 4 fois une demi-seconde, pour le fixer.

Le frottis étant fixé, la lame ne présente plus de danger de contamination. On peut alors effectuer la coloration désirée.

Remarque : avant de colorer, il faut attendre que la lame refroidisse sous peine de cristallisation du premier colorant ou de casse de la lame.

6.4.1.3 *Coloration de Gram*

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 à ensemencer. etc.

Au terme du processus de coloration, les bactéries dites « Gram négatifs » apparaissent roses tandis que les bactéries dites « Gram positifs » sont colorées en bleu foncé/violet (Baldent, 1997).

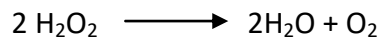
6.4.1.3.1 Principe :

Les bactéries sont imprégnées par une première solution colorante, le violet de gentiane, puis elles sont fixées par un mordant, la solution de Lugol (solution d'iode dans l'iodure de potassium). On fait ensuite agir un décolorant (alcool le plus souvent), suivant la composition de leur paroi : certaines bactéries résistent à cette décoloration et apparaissent colorées en violet elles sont dites Gram positif.

D'autres bactéries ne résistent pas et ne sont plus visibles. On doit donc utiliser un deuxième colorant de teinte contrastante (fuchsine, ou safranine, colorants rouges), ces bactéries apparaissent alors colorées en rose, elles sont dites Gram négatif (Baldent, 1997).

6.4.1.4 Recherche de la catalase :

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



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

Seuls les isolats catalase négatives et Gram positifs sont retenus pour une identification (Labioui et al, 2005).

6.4.2 Tests Biochimiques :

6.4.2.1 Recherche du nitrate-réductase :

Cette enzyme est capable de catalyser la réaction de réduction des nitrates (NO₃⁻). À une culture en milieu nitraté ensemencé et incubé à 30 °C, on rajoute le réactif nitrate I (acide sulfanilique), puis le réactif nitrate II (α-naphtylamine). La coloration en rouge indique que le nitrate est dégradé par la bactérie. C'est il y a une absence de coloration on ajoute la poudre de zinc, après environ 5 minutes, l'absence de coloration la bactérie a Nitrate positif, la bactérie réduisent les nitrites jusqu'au stade azote gazeux et la coloration en rouge ou rose indique que la bactérie ne possède pas le nitrate réductase (Larparent, 1997).

6.4.2.2 Test Mannitol-Mobilité :

Le test permettant de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et l'étude de la mobilité de la souche. L'ensemencement du milieu s'est fait par piqure centrale dans le culot jusqu'au fond du tube. Après 24 h à 30°C d'incubation. La fermentation du mannitol est traduite par un virage au jaune du milieu de culture (Guiraud, 2003, Denis *et al.*, 2007). La mobilité se traduit par la diffusion des bactéries à partir de la ligne d'ensemencement vers la périphérie, en créant une turbidité. Les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la piqure centrale (Amara et Khaladi, 2015).

6.4.2.3 Test Citrate de Simmons

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone : le citrate ; seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu. La pente du milieu est ensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une anse contenant une colonie et incubée à 30 °C pendant 3 jours.

- Citrate-positif : culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu).
- Citrate négative : pas de culture (coloration verte de milieu inchangée) (Marchal *et al.*, 1991).

6.4.2.4 Test de production d'acétoïne (VP/RM)

La recherche de l'acétoïne est testée par la réaction de Voges-Proskauer (VP) (Harrigan et McCance, 1976 ;Zourari et al., 1991 ;Facklam et Elliot, 1995). Des tubes contenant chacun 5 ml de milieu Clark et Lubs sont ensemencés à l'aide d'une anse, après incubation à 30 °C pendant 18 à 48 h, on ajoute trois gouttes de réactif VP1 et le même volume du réactif VP2 (alpha-naphtol à 6 % dans l'alcool à 95 °). On Agite soigneusement les tubes et on attend un temps maximum de 10 min.

Une teinte rouge cerise (anneau) indique une réaction VP positive (Marchal et al., 1991).

Le rouge de méthyle différencie le processus de fermentation, il est jaune au-dessus d'un pH de 6,3 et rouge en dessous de 4,2. La production d'acétylméthylcarbinol se révèle par l'apparition d'une coloration rouge en surface du milieu.

Après incubation, transvaser 2 ml du milieu dans un autre tube et ajouter 1 à 2 gouttes d'une solution à 0,5 % de rouge de méthyle dans l'alcool à 60°. Une coloration rouge du milieu, correspondant à un pH inférieur à 4,2, est considérée comme positive. Une coloration jaune du milieu, correspondant à un pH supérieur à 6,3, est considérée comme négative.

6.4.2.5 Test d'utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron (TSI) :

La pente du milieu TSI est ensemencée par stries et le culot par pique centrale. Après, une incubation à 30°C pendant 24 h :

- Le virage du culot au jaune traduit la fermentation du glucose.
- La présence de bulles de gaz signifie la fermentation avec production du gaz.
- Le virage de la pente au jaune traduit l'utilisation du lactose ou saccharose ou les deux à la fois.
- Une coloration noire signifie la production d'hydrogène sulfuré(H₂S) (Khaladi et al 2015).

6.4.2.6 Test de croissance à différentes températures

Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles et les bactéries lactiques thermophiles (Leveau et al, 1991). Le test est réalisé sur milieux MRS liquides à différentes températures 7 °C et 40 °C, 37 °C pendant 24 à 48 h, la croissance cellulaire est appréciée par la présence d'un trouble (Badis et al., 2005 ; Hariri et al., 2009).

Résultats

Resultats

Tableau 1: Récapitulatif des tests biochimiques

Isolats	Gram	Catalase	Citrate	Nitrate	VP	RM	Mannitol		TSI		Températures		
							Ferm	Mob	H ₂ S	Ferm	7°C	37°C	40°C
L11	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
L22B	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
L24A	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
L25A	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
L30A	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
L42	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
L46	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
L64	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
L101	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
L108	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+

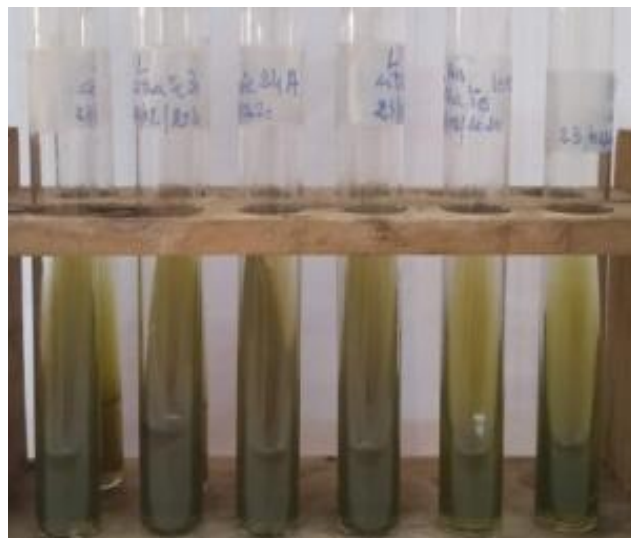


Figure 14 Résultats test citrate de Simmon

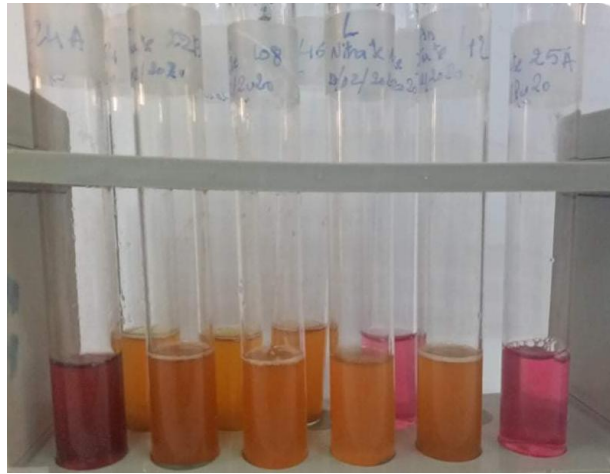


Figure 15 Résultats test Nitrate + confirmation zinc

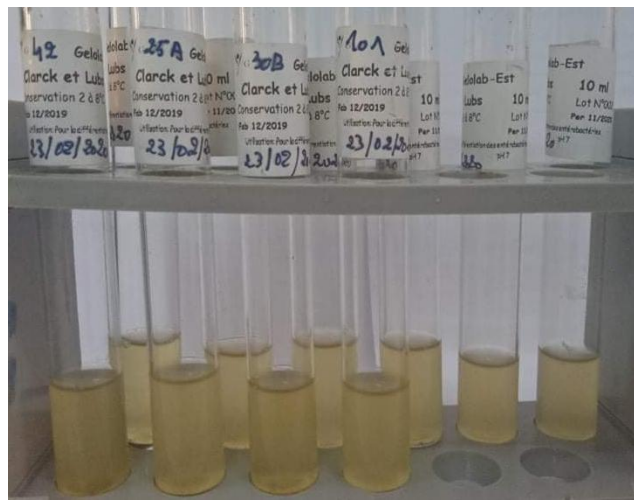


Figure 16 Résultats test réaction de Voges-Proskauer

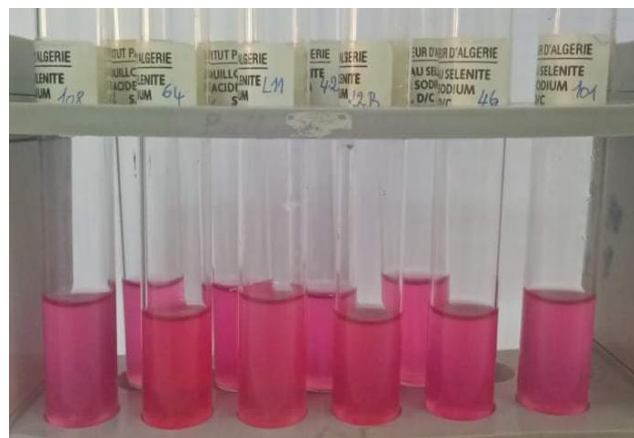


Figure 17 Résultats test Rouge de Méthyl

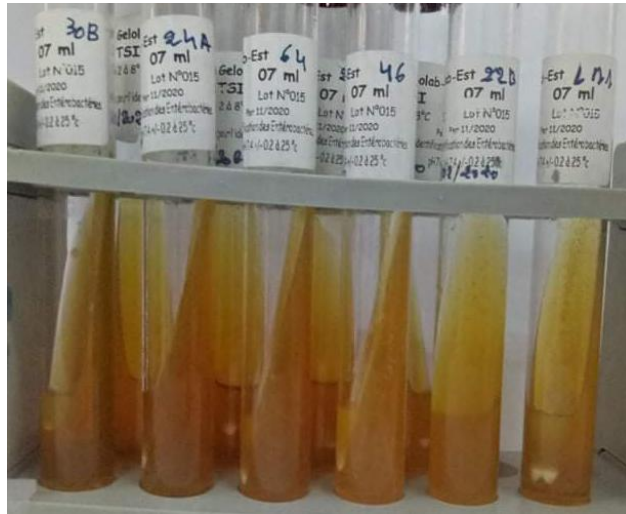


Figure 18 Résultats test TSI

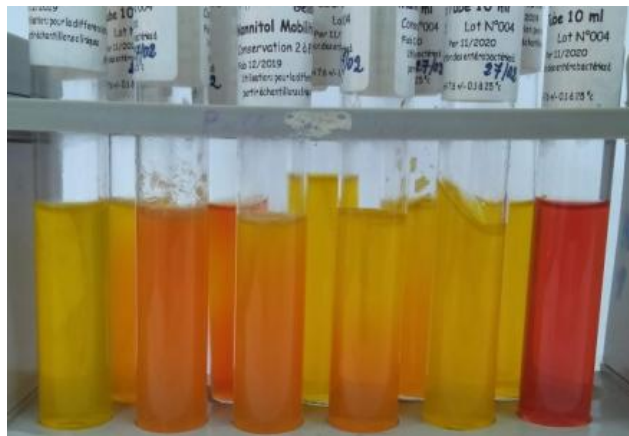


Figure 19 Résultats test Mannitol mobilité

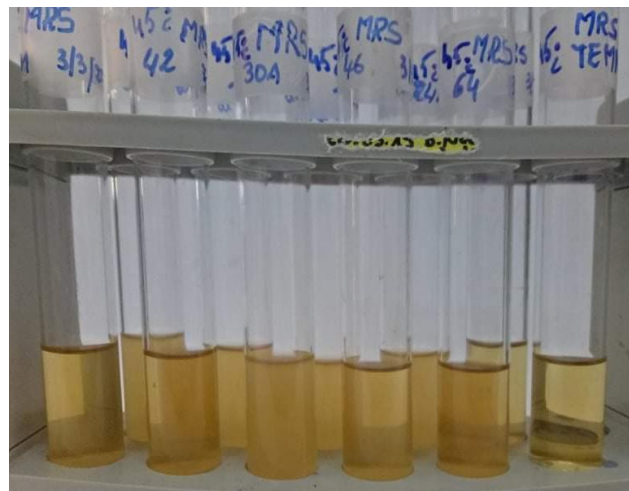


Figure 20 Résultats du test de croissance à 45°C

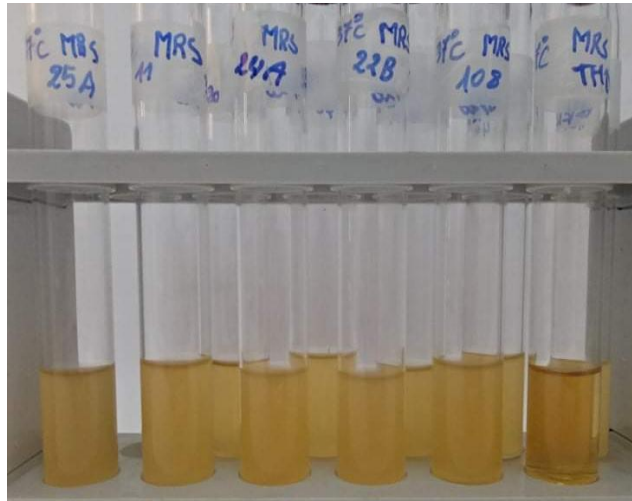


Figure 21 Résultats du test de croissance à 37 °C

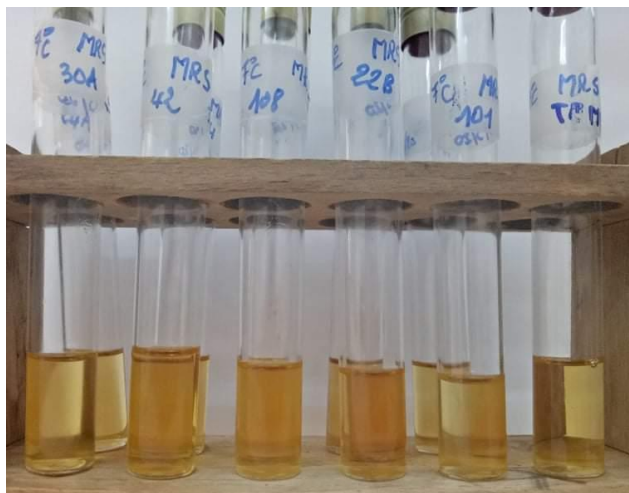


Figure 22 Résultats du test de croissance à 7°C

Référence Bibliographique

Reference bibliographique

A

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

Ait-Slimane I. & Ait-Kaki S., 2008 : Contribution à l'étude de l'interaction génotype x milieu, pour la qualité technologiques chez le blé dur en Algérie.

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

Amara I. & Khaldi Z., 2015: Isolement, identification et étude de l'antibiorésistance des souches bactériennes isolées à partir de services de réanimation et d'hémodialyse de CHU Ouargla. Mémoire de master en Biologie, spécialité microbiologie appliquée, Université de Ouargla, 98p.

Amatayakul T., 2005, Physical characteristics of set yogurts as affected by co-culturing with non-EPS and EPS starter cultures and supplementation with WPC, *Australian Journal of Dairy Technology* 60 (3): 238-243.

Ammor, S., Tauveron, G., Duffour, E., and Chevallier, I. (2006). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same small-scale facility producing traditional dry sausages: 1- Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17 (6), pp. 454-461.

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

Axelsson L. 2004. Classification and physiology in: *Lactic bacteria : Microbiological and functional aspects*. Salsinen S. Wright A V Ouweland A 3^{ème} ed New York Marcel Dekker Inc Vol, 633-1-66.

Axelsson L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology In: *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (eds: Salminen S, von Wright A, and Ouweland AC). Third edition Marcel Dekker Inc New York, pp:1-66.

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

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

Aziz, M. K., H. Khan, W. Akhtar, I. Mahsud, and B. Ashiq. 2004. Accuracy of Griess test to predict asymptomatic bacteriuria during pregnancy. *Gomal J. Med. Sci.* 2:20-23.

B

Badis A, Laubdia –Sellami L, Guetarni D, Kihal M, 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 et technologie n°23, P: 12-167.

Badis et al., (2005) ; Hariri et al., 2009). Badis A, Laouabdia SN ,Guetarni, Ouzrout R.- Caractérisation phénotypiques des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « arabia et kabyle », Sciences et technologie, 2005; 23 : 30-37.

Bahorun T. 1997. Substances naturelles actives La flore Mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research council Mauritius pp: 83-94.

Baldent., 1997. Coloration usuelles en Bactériologie. Revue de Développement et santé. Février (1997). www.ledamed.org.

Bartali E., FAO, 1995 : http://www.cd3wd.com/cd3wd_40/INPHO/VLIBRARY/MOVE_REP/X0289E/FR/X0289F00.HTM

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

Bayer Healthcare. 2005. Multistix package insert. Bayer Healthcare, Elkhart, IN. http://www.cliawaived.com/web/items/pdf/SEMDIA-2182_Bayer_Hema_Combistix_insert~1198file1.pdf

Becton, Dickinson and Company. 2006. BBL nitrate broth with Durham tube package insert. Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD. <http://bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L007480%2807%29%280506%29.pdf> 5.

Becton, Dickinson and Company. 2010. B D nitrate A, nitrate B, and nitrate C reagent droppers package insert. Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD. [http://bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L001190\(201006\).pdf](http://bd.com/ds/technicalCenter/inserts/L001190(201006).pdf).

Becton, Dickinson and Company. 2010. BD BBL taxodifferentiation discs nitrate package insert. Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD. [http://bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8820281\(201006\).pdf](http://bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8820281(201006).pdf).

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

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

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

Bérubé-Gagnon J. 2006. Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Quebec.

Biomerieux. 2009. Nitrate, nitrite media package insert. BiomerieuxBoucher L, and Moineau S.2001. Phages of *Lactococcus Lactis* :an ecological and economical equilibrium. *RécentResDevelVirol*, 3: 243-256.

Bouzar F., Cerning J., Desmazeaud M.J., 1997, Exopolysaccharide production and texturepromoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production, *Journal of Dairy Science*, 80 (10): 2310-2317.

Broadbent J.R., McMahon D.J., Welker D.L., Oberg C.J., Moineau S., 2003, Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: A Review, *Journal of Dairy Science*, 86 (2): 407-423.

C

Campbell, W. H., P. Song, and G. G. Barbier. 2006. Nitrate reductase for nitrate analysis in water. *Environ. Chem. Lett.* 4:69–73.

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

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

Centers for Disease Control and Prevention. 2008. Nitrate reduction test. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta,GA.<http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/tests/nitrate.htm>.

Cerning J., 1990 Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, 87 (1-2): 113-130.

Cerning J., Bouillanne C., Desmazeaud M.J., Landon M., 1988, Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*, *Biotechnology Letters*, 10: 255-260.

Cerning J., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M.J., 1992, Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria, *Journal of Dairy Science*, 75 (3): 692-699.

Chapin, K., and T.-L. Lauderdale. 2007. Reagents, stains, and media: bacteriology, p. 339. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, J. H.

Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Loubière P., Lindley N.D. (1996). Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*, *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 70, p. 253–26.

Collins M.D et Aguirre, M. (1993): Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacterial*, 75:95-107.

Colwell, R.R.(1970). Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio* numerical taxonomy of *Vibrio cholera parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. *J. Bacteriol* 104, 410-433.

Corrieu, G. & Luquet, F. M.(2008) Bactéries lactiques : De la génétique au ferment. Paris: Édition Tec et Doc p. 849.

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

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

D

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

Davis, B. D., R. Dulbecco, H. N. Eisen, and H. S. Ginsberg. 1980. *Microbiology*, 3rd ed. Harper and Row Publishers, Hagerstown, MD.

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

De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem F., Degeest B., 2001, Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 11(9): 687-707.

De Vuyst L., Degeest B., 1999, Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 23 (2): 153-177.

De Vuyst L., Vanderveken F., Van de Ven S., Degeest B., 1998, Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis, *Journal of Applied Microbiology*, 84 (6): 1059-1068.

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

Degeest B., De Vuyst L., 1999, Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (7): 2863-2870.

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

Devoyod JJ, and Muller M.1969. La flore microbienne du fromage de Roquefort, III Les streptocoques lactiques et les leuconostoc, Influence de différents microorganismes de contamination Le Lait, pp: 369-399.

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

Difco Manual, 11th edition. 1998, page 521

Difco. 1998. Difco manual, 11th ed. DifcoLaboratories, Detroit, MI.

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

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

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

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

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

Doumandji A, Doumandji-mitiche B, Salaheddine D. 2003. Cours de technologie des céréales technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage.Office des Publications Universitaires, pp: 1-22.

Doumandji A., Doumandji- Mitiche B. & Salaheddine D., 2003: Cours de technologie des céréales technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage. Office des Publications Universitaires, pp : 1-22.

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

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

Druvefors Ulrika A. &Schnürer J., 2004: Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. *FEMS yeastResearch.* 5: 373-378.

Duboc P., Mollet B., 2001, Applications of exopolysaccharides in the dairy industry, *International Dairy Journal*, 11 (9): 759-768.

Durham, NC.<http://www.pmlmicro.com/assets/TDS/555.pdf>.

E

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

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

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

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

F

FAO., 2007: Perspectives alimentaires. Analyse des marchés mondiales. <http://www.fao.org/010/ah864f/ah864f00.htm>. (31.5.2008/13:28).

Feillet P., 2000: Le grain de blé : Composition et utilisation. Ed : Quae. INRA Paris, pp : 55-75

Ferret M., 1996: Blé dur, objectif qualité. Ed : ITCF. 43p.

Fluka Analytical. 2008. Nitrate reduction test package insert. Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland. <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Fluka/Datasheet/73426dat.Par.0001.File.tmp/73426dat.pdf>.

Fluka Analytical. 2008. Nitrate broth package insert. Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland. <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Fluka/Datasheet/72548dat.Par.0001.File.tmp/72548dat.pdf>.

Forbes, B. A., D. F. Sahm, and A. Weissfeld (ed). 2002. Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 11th ed., p. 277-278. Mosby, St. Louis, MO.

G

Gálvez A., Lopez R.L., Abriouel H., Valdivia E. & Omar N.B.(2008) Application of bacteriocins in the control of food borne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28: 125-135.

Geis, A. (1989). Antagonistic compounds produced by lactic acid bacteria. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte.* 41, 97-104.

Georges C, Francois M L. 2008. 30 sur bactéries lactiques. pp: 12-16.

Georges C, Francois M L. 2008. Bactéries lactiques, De la génétique aux ferments. Lavoisier ISBN: 2-7430-1016-4, ISSN: 0243-5624, P: 19-21-23.

Gephart, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. King. 1994. *Methods for General and Molecular Bacteriology*, ASM Press, Washington DC. Hajna, A. A. 1945. Triple-sugar iron agar medium for the identification of the intestinal group of bacteria. *J. Bacteriol.* 49:516-517.

Gilarova, R., Voldrich, M., Demnerova, K., Cerovsky, M. & Dobias, J. (1994). Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *Int. J. Microbiol.* 24:315-319.

Giraud, 2003. *Microbiologie alimentaire, Technique et ingénierie*, Dunod, série Agroalimentaire, Paris, 2003; 652.

Givry, S. et Duchiron, F. (2008). Optimization of Culture Medium and Growth Conditions for Production of L-Arabinose Isomerase and D-Xylose Isomerase by *Lactobacillus bif fermentans*. *Microbiology* 77 (3): 281–287.

Gomez, A.M.P. and Malcata, F.X. (1999). "*Bifidobacterium* sp and *Lactobacillus acidophilus*: biological, technological, biochemical and therapeutical properties relevant for use as probiotics" *Trends in Food Science & Technology* 10: 139-157.

Guder, A., Schmitter, T., Wiedemann, I., Sahl, H. G., and Bierbaum, G. (2002) Role of the single regulator MrsR1 and the two-component system MrsR2/K2 in the regulation of mersacidin production and immunity. *Appl Environ Microbiol.* 68: 106-113.

Guignard J-L. & Dupont F., 2004: *Botanique Systématique Moléculaire*. 13 Ed révisée, Ed : Masson, Paris, pp : 116-117.

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

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

H

Harian JR., 1975: *Crops and man*. Eds John Wiley and Sons. NY. 350P. In: *Etude de la contribution des paramètres phéno morphologiques dans l'adaptation du blé dur (Triticum durum Desf) dans l'étage bioclimatique semi aride*.

Hariri A, Ouis N, Sahnouni F, Djilali B.- Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube, *Revue Microbiological. Environnement, Congrès international BIOMED 1 Marrakech du 2-5 Novembre, 2009 ; pp37-55*.

Harrigan W.F., McCance M.E., 1976. Eds., *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology* Academic Press, Orlando.

Hassan A.N., 2008, ADSA Foundation scholar award: Possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods, *Journal of Dairy Science*, 91 (4): 1282-1298.

Helander, I.M., Von Wright., et Mattila- Sandholm, TM. (1997). Potentiel of lactic acid bacteria novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 8:146-150.

Heng, N. C. K., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., and Tagg, J. R. (2007a) The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley, M. A., and Chavan, M. A. (Eds). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer Verlag. Berlin Germany. pp 45-92.

Heng, N. C. K., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., and Tagg, J. R. (2007a) The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley, M. A., and Chavan, M. A. (Eds). Bacteriocins: Ecology and Evolution. Springer Verlag. Berlin Germany. pp 45-92.

Hess J.S., Roberts R.F., Ziegler G.R., 1997, Rheological properties of nonfat yoghurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharides or using commercial stabilizer systems, *Journal of Dairy Science*, 80: 252-263.

Ho T.N.T., Taun N., Deschamps A., Cauber, T. (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam: Workshop on Food Safety and Processing Technology, p. 134-142.

Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. et Schillinger U.(2001).Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*73 (Suppl): 365-373.

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

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

Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. et Schillinger U.(2001).Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*73 (Suppl): 365-373.

Hugenholtz J. &Kleerebezem M. (1999). Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10(5), 492-497.

I

Isenberg and Garcia (ed.). 2004 (update, 2007). *Clinical microbiology procedures handbook*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 8. Barritt. 1936. *J. Pathol.* 42:441.

J

Jeanet R., Croguennec T., PSchuck P. & Gerard B., 2007: *Science des aliments : Biochimie Microbiologie. Procédés produits*, pp : 138-159.

Jiminez-Diaz, R., Rios,R.M., Desmazeaud, m., Ruiz-Barba, J.J. et Piard, J.C. (1993). Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. *Appl.Environ. Microbiol.*59:1416-1424

Jolly L., Stingle F., 2001, Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 11 (9): 733-745.

Jorgensen, M. L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 9th ed. ASM Press, Washington, DC.

K

Kandler, O., et Weiss, N.(1986).Genus Lactobacillus Beijerinck 1901. In Bergey's manual of systematic bacteriology..1209-1234. Edited by P.H.A.Sneath, N.S. Mair, M.E.Sharpe et J.G.Holt.Baltimore: William et Wilkin.

Kandler,O.(1983). Carbohydrates metabolism in lactic acid bacteria.*Antoniev van Leeuwenhoek*49:209-224.

Kashet, E.R.(1987). Bioenergies of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH osmotolerance. *FEMS Microbiol.Rev.*46: 233-244.

Kermiche M., 2013: Caractérisation de certaines souches microbiennes évoluant dans le blé fermenté et mise en évidence de leurs activités enzymatiques. Mémoire de magister en sciences alimentaires, option biotechnologie alimentaire, Université Constantine 1, 123p.

Khalid, N.M., et Marth, E.H. (1990). Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening spoilage of cheese. *Rev.DairySc*, 73:158-167.

Klaenhammer, T.R. (1988): Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70 (3), 337-349

Klaenhammer, T.R. (1988): Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70 (3), 337-349.

Klaenhammer, T.R. (1993).Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria *FEMS Microbiology*, 12:39-89

Klein, G., Pack, A.,et Bonaparte, G.(1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int.J.Food Microbiol.*41:103-125.

L

Labioui H., Elmoualdi L., El Yachoui M., &Ouhssine M., 2005: Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*. 144 : 237-250.

Labioui, H., El Moualdi, L.,ElYachoui,,M.,Ouhssine,M.(2005). Selections de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de la société de pharmacie de Bordeaux*. 144 : 237-250.

Lahtinen S., Salminen S., Ouwehand A., Wright A.V. (2011). *Lactic acid bacteria, Microbiological and functional aspects*. 4^{ème} édition. Boca Raton : CRC Press.

Larpent JP et Larpent MG. 1990. *Memento technique de microbiologie*. Second ED technique et documentaire Lavoisier, pp: 417-420.

Larpent, J.P. (1997). *Mémento technique de microbiologie*. 3^{ème} Ed. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. Pp 910.

Larpent, J.P. (1997). *Mémento technique de microbiologie*. 3^{ème} Ed. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. Pp 910.

Larpent, J.P. (1997). *Mémento technique de microbiologie*. 3^{ème} Ed. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. Pp 910.

Leahy S. C., Higgins D. G., Fitzgerald G. F. and Van Sinderen D. (2005). Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98 pp: 1303-1315. Leatherhead Food Research, 2009.

Leclerc, H., Gaillard, F.L. et Simonet, M. (1994). Les grands groupes de bacteries. In : *Microbiologie générale : La bactérie et le monde microbien*. DOIN. Paris.445p.

Leisner, J.J., Vancanneyt, M., Goris, G., Christensen, Het Rusul, G. (2000). Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chillibo. a Malisian food ingredient. *Int. J. Sys Evol. Microbiol.* 50: 19-24.

Leveau J.Y., Boiux M. et De Roissart H.B. (1991). *La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires*. 2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3: 240P.

Leveau J.Y., Boiux M. et De Roissart H.B. (1991). *La flore lactique : technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires*. 2e Ed., Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3: 240P.

Loubière, P & Coccagn-Bousquet, M (2009). *Métabolisme des bactéries lactiques : devenir du carbone*. Dans *bactéries lactiques physiologie, métabolisme génomique et applications industrielles*, Paris, France : Drider, D and Prévost, H. , p.29-50.

M

MacFaddin, J. F. 2000. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

MacFaddin, J.F. 2000. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 3rd. ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Macura D., Townsley P.M., 1984, Scandinavian ropy milk: Identification and characterization of endogenous ropy lactic streptococci and their extracellular excretion, *Journal of Dairy Science*, 67 (4): 735-744.

Makarova, K.S. & Koonin, E.V.(2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J. Bacteriol* 189, 1199-1208.

Marchal N., Bourdon JL, Richard CL.-*Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries* .3 ème Edition Doin éditeurs, Paris, 1991

Marshall V.M., Rawson H.L., 1999, Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt, *International Journal of Food Science and Technology*, 34 (2) : 137-143.

Meghrous, J., Lacroix, C. and Simard, R.E.(1999). The effect of vegetative cells spores of three bactériocines from lactic acid bacteria. *Food Microbiology*;16: 105-114

Mokhtari S., Effet protecteur de certaines bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté type Hamoum. *Mémoire de magister en physiologie de la nutrition et de sécurité alimentaire*, Université d'Oran, 165p.

Molinié A, &Pfohl-Leszkowicz A. 2003. Les mycotoxines dans les céréales : les points importants de contrôle de la production au stockage, le devenir dans les produits dérivés.Laboratoire de Toxicologie et sécurité alimentaire-Auzeville-Tolosane.Note de l'ASEDIS- SO N° spécial Mycotoxines, pp: 9.

Monsan P., Bozonnet S., Albenne C., Joucla G., Willemot R.-M., Remaud-Siméon M., 2001, Homopolysaccharides fromlacticacidbacteria, International Dairy Journal, 11 (9): 675-685.

Morency, H., Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C., and Lavoie, M. C. (2001). Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. Can J Microbiol.47: 322-331.

Morency, H., Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C., and Lavoie, M. C. (2001).Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. Can J Microbiol.47: 322-331.

Mosiniak M., Prat R. & Roland JC., 2001: Du blé Au pain. Ed : Biologie et Multimédia », <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/blepain/blepres/blepres.htm>.

Multon JL. 1982. Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés: céréales, protéagineux; oléagineux, aliment pour animaux. Technique et Documentation Ed Lavoisier paris, pp: 576.

Murray, Baron, Jorgensen, Landry and Pfaller (ed.). 2007. Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

N

Nedjah I., 2015: Changements physiologiques chez des plantes (Blé dur *Triticumdurum*Desf.) exposées à une pollution par un métal lourd (plomb). Thèse de doctorat du troisieme cycle, Université Badji Mokhtar – Annaba, 144p.

Nielsen D.S., Jacobsen T., JespersenL., KochA.G., ArneborgN.(2008). Occurrence and growth of yeasts in processed meat products -Implications for potential spoilage. Meat Science, vol. 80, p. 919-926.

Nigutova K. (2007). Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enIA homologues among ruminal Gram+ cocci. J. Appl. Microbiol., 102(2), 563-569.

Nilsen, T.I.Nes, F and Holo, H.(2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Applied and Environmental Microbiology 69:2975-2984.

O

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

P

Papagiani, M.,(2003). Ribosomallysynthesized peptides wwith antimicrobial properties biosynthesis, structuren function and applications. Biotechno.Adv.21:465499

Papagianni, M., and Anastasiadou, S. (2009) Pediocins: The bacteriocins of Pediococci. Sources, production, properties and applications. *Microb Cell Fact.*8: 3.

Petry S., Furlana S, Waghornec E., Saulnier L., Cerning J., Maguin E., 2003, Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides, *FEMS Microbiology Letter*, 221: 285-291.

Petry S., Furlana S, Waghornec E., Saulnier L., Cerning J., Maguin E., 2003, Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides, *FEMS Microbiology Letter*, 221: 285-291.

Piard, J.C.; Desmazeaud, M.J. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. I. Oxygen metabolites and catabolism end products. *Le Lait*, 71, 525.

Piard, J.C.; Desmazeaud, M.J. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. I. Oxygen metabolites and catabolism end products. *Le Lait*, 71, 525.

Pilet M.F., Magras C., Federighi M., (2005). Bactéries lactiques. *In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica.* Paris. 219-240.

Pomeranz Y., 1987: Cereal Crops general. In *Modern cereal science and technology* Pomeranz Y (eds), VCH Publishers, Inc, New York. Pp: 14-23.

Pot B. (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. *In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier.* Paris.1-106.

R

Reddy, C. A. (ed.). 2007. *Methods for general and molecular microbiology*, 3rd ed. ASM Press, Washington, DC.

Rodríguez, J. M., Martínez, M., and Kok, J. (2002) Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr.*42: 91-121.

Ruas-Madiedo P., de los Reyes-Gavilan C.G., 2005, Invited Review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *Journal of Dairy Science*, 88 (3): 843-856.

Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., Zoon P., 2002a, An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 12 (2-3): 163-171.

Ruel T., 2006: Document sur la culture du blé, Ed: Educagri.18p.

Ruiz- Moyano, S., Martin, A., Benita, M.J., Nevado, F.P., Cordoba, M.G.(2008). *Meat Sciences*, (80), 715-721.

S

Savijoki K., Ingmer H. et Varmanen P.(2006.) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71 : 394-406.

Selmi R., 2000: Fin du mythe de l'autosuffisance alimentaire et place aux avantages comparatifs. Revue Afrique Agriculture. N° 280 :30-23.

Simmons, J. S. 1926. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. J. Infect. Dis. 39:209–214.

Simpson , W.J et Taguchi, H.(1995). The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. In the Genera of lactic acid bacteria, Wood BJB., Holzapfel WH, Eds; Chapman & Hall, London, 125-172.

Singleton, P. 1999. bactériologie. 4eme edition. Dunod, paris. 317 pages.

Sperber. H. and Swan J. (1976). Hot-loop test for the determination of carbon dioxide production from glucose by lactic acid bacteria. Environ Microbiol, vol.31, p. 990-991.

Stiles ME, et Holzapfel WH. 1997. Review article Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int J Food Microbiol, 36: 1-29.

Stiles, M.E. and W.H. (Holzapfel, 1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food. Microbiol 36, 1-29.

Stiles, M.E. and W.H. (Holzapfel, 1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food. Microbiol 36, 1-29.

T

TAHLAITI H.(2018). Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté ,These de Doctora, Université Abdelhamid Ben Badis ,Mostaganem, 205p.

Tamang, J.P. (2010d). Fermented cereals. In Himalayan fermented foods: microbiology, nutrition, and ethnic values. CRC Press, Boca Raton.

Tamime A.Y., (2002). Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-36.

Tang, Y. W., N. M. Ellis, M. K. Hopkins, D. H. Smith, D. E. Dodge, and D. H. Persing. 1998. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. J. Clin. Microbiol. 36:3674–3679.

Thompson J., Gentry-Weeks C.R., (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). Loriga, Uriage. 1: 239-290.

Thompson, J. (1987). Sugar transport in lactic acid bacteria. Sugar transport and metabolism in gram-positive bacteria. Editeurs Reizer J., Peterkofsky A., Ellis Horwood Ltd., Chichester, Royaume-Uni. 15-38.

Tossi, A., et Sandri, L. (2002). Molecular diversity in gene encoded, cationic antimicrobials polypeptides. 8(9):743-761.

Tosukhowong A., Nakayama J., Mizunoe Y., Sugimoto S., Fukuda D. et Sonomoto K., (2005). Reconstitution and function of *Tetragenococcus halophila* chaperonin 60 tetradecamer. *J. Biosci. Bioengin.* 99: 30-37.

V

Vaningelgem F., Meulen R.V.D., Zamfir M., Adriany T., Laws A.P., Vuyst L.D., 2004a, *Streptococcus thermophilus* ST111 produces a stable high-molecular-mass exopolysaccharide in milk-based medium, *International Dairy Journal*, 14 (10): 857864.

Ventura M, & Zink R. 2002. Rapid identification, differentiation and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium Lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 68: 6429-6434.

Vermeiren L, Devlieghere F, et Debevere J. 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int J Food Microbiol*, 96: 149- 164.

Vollenweider, S. (2004). 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotech.* 64, 16-27.

W

Wallace, T. D., Bradley, S., Buckley, N. D. & Green-Johnson, J. H. (2003). Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. *Journal of Food Protection* 2003. Vol. 66 (3) : 466-472.

Wijtzes, T., Bruggeman, M., Nout, M., Zwietering, M. (1997). A computerized system for the identification of lactic acid bacteria. *J. Food. Microbiol.* 64, 65-70.

Y

Yano Y, Satomi M, Oikawa H. 2006. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International J Food Microbiology*, 111: 6-11.

Yateem, A.A., Balba, M.T. Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R. (2008). Isolation of acid lactic bacteria with probiotic potential from camel milk. *Int. J. Dairy Sci.* 3:194-199.

ANNEXE I : Les milieux de cultures et réactifs

1. Milieux Liquides

Milieu MRS(pH 6,5)

Pour 1 litre de milieu :

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween80.....	1ml
Phosphate dipotassique K_2HPO_4	2g
Acétate de sodium5g
Citrate d'ammonium2g
Sulfate de magnésium, $MgSO_4$	0.2g
Sulfate de manganèse, $MnSO_4$	0.5g
Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

Bouillon Clark et Lubs (MR-VP)

Pour 1 litre de milieu :

Peptone	7g
Glucose	5g
Phosphate dipotassique K_2HPO_4	5g
Eau distillée.....	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 15 min

LAPTg(ph 6.6)

Pour 1 litre de milieu :

Extrait de levure	10g
Peptone	10g
Tryptone	10g
Glucose	10g
Tween 80	10ml
Eau distillée.....	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 15 min

PBS 1x

NaCl	8 g
KCl.....	200 mg
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	245 mg

Indole

Tryptone	10g
Chlorure de sodium	5g

Nitrate

Milieu de réduction des nitrates

ExtraitViande.....	3g
Gélatine peptone	5g
Nitrate de potassium (KNO ₃)	1g
Eau déionisée	1000ml

Téléchargé depuis www.asmscience.org par IP: 41.99.141.29 Sur: Jeu 09 janv.2020 19:42:46 Société américaine de microbiologie © 2016

2. Milieux Solides

Milieu MRS (pH 6,5)

Pour 1 litre de milieu :

Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween80.....	1ml
Phosphate bipotassique K ₂ HP.....	2g
Agar (cat 611001)	18g
Acétate de sodium5g
Citrate d'ammonium2g
Sulfate de magnésium, MgSO ₄	0.2g
Sulfate de manganèse, MnSO ₄	0.5g

Eau distillée qsp 1000ml

Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

MRSCysteine

Milieu MRS + L cysteineHCl .2 g/l

MRS Carbonate de Calcium

Milieu MRS + Carbonate de calcium. 10g/l

Citrate de Simon (pH 6.9)

Pour 1 litre de milieu :

Ammonium dihydrogène phosphate.....	1g
Phosphate dipotassique H_2PO_4	1g
Citrate de sodium.....	2g
Chlorure de sodium	5g
Sulfate de magnésium $MgSO_4$	0.2g
Agar (cat 611001)	15g
Bleu de Bromothymol.....	0.08
Eau distillée qsp	1000ml

Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 15 min

TSI

Digestion pancréatique de caséine USP	10g
Digestion peptique de tissu animal	10g
Glucose	1g
Lactose	10g
Saccharose	10g
Sulfate ferreux ou ferreux sulfate d'ammonium	0,2g
NaCl	5g

Thiosulfate de sodium0,3g
Rouge de phénol.....0,024g
Gélose13g
Eau distillée.....1000ml

Mannitol-mobilité

Peptone trypsique de viande 20g
Agar.....4g
Mannitol.....2g
KNO₃.....1g
Rouge de phénol à 1 %4ml
Eau distillée q.s.p1000ml

pH=7.6-7.8 Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 15 min

ANNEXE II : Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant 1 min puis rincer
- Ajouter du lugol pendant 1 min puis rincer
- Décolorer avec de l'alcool pendant 19 secondes, puis rincer à l'eau.
- Faire une contre coloration en utilisant Safranine et laisser agir 1 min ;
- Laver à l'eau
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.