

Université Ibn Khaldoun, Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présenté par :

Mme. BOUCHOUGRANE Sara Souad.

Intitulé

Criblage des bactéries lactiques productrices de GABA

Soutenu publiquement le : 10/07/2025

Devant les membres de jury :

Président	Dr. MOULAY Meriem
Examineur	Dr. BOUBAKEUR Badra
Encadrant	Dr. SASSI Soumia
Co-encadrant	Pr. SASSI Mohamed

Année universitaire 2024-2025

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents, à mon mari,

à mes enfants et mes frères

à toute ma famille

ainsi qu'à tous mes amis

Je le dédie également à tous mes élèves, qui m'inspirent chaque jour par leur soif

de savoir

À tous mes enseignants :

À ceux de l'école primaire, qui m'ont transmis les premières bases du savoir

À ceux du collège et du lycée, qui ont éveillé en moi la curiosité et l'esprit critique

À mes professeurs d'université, qui m'ont guidée avec rigueur et bienveillance sur

le chemin de la science.

À vous tous, ma profonde gratitude

Remerciement

Avant tout, je rends grâce à **Allah**, le Tout-Puissant, qui m'a accordé la force, la volonté et le courage nécessaires pour mener à bien ce travail. Que Son nom soit loué pour m'avoir éclairé le chemin vers la réussite.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au **Professeur SASSI Mohamed** et à la **Docteure SASSI Soumaya**, pour m'avoir proposé ce sujet, pour leurs conseils scientifiques judicieux et pour leur encadrement constant tout au long de cette recherche et ce malgré leur nombreuse responsabilité professionnelle.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mes enseignants, les **Professeurs** monsieur **TAIBI Khaled**, madame **TAIBI Leila** et monsieur **SOUANA Kadda** et ainsi qu'à l'ensemble des enseignants de biologie moléculaire, pour leur accompagnement bienveillant et à tous les enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret.

Je remercie **Mme Moulay Meriem** qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

J'adresse également mes vifs remerciements à **Mme Boubakeur Badra** pour sa participation à l'évaluation de ce travail.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à toutes les personnes qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

ADH	Arginine décarboxylase
ARN	Acide ribonucléique
BFH	Blé fermenté type hamoum
BL	Bactéries lactiques
DO	Densité optique
GABA	Acide γ -aminobutyrique
LAB	Lactic Acid Bacteria
LDH	Lactate déshydrogénase
MRS	Man, Rogosa and Sharpe (milieu de culture)
MSG	Glutamate monosodique
ODC	Ornithine décarboxylase
ONPG	Orthonitrophényl- β -D-galactosipyranoside
PCR	Polymerase Chain Reaction
TCA	Acide trichloroacétique
TSI	Gélose triple sugar-iron agar

Liste des tableaux

Tableau 1: compare les deux principaux types de récepteurs du neurotransmetteur GABA	5
Tableau 2: comparatif centré sur le rôle du GABA dans les phases du sommeil NREM et REM: (Brown, R. E., et al, 2012; Luppi, P. H., et al, 2017; Peever, J., 2017).	6
Tableau 3 : Classification traditionnelle basée sur les caractères phénotypiques (Axelsson 2015).	12
Tableau 4: Classification génomique moderne des bactéries lactiques.	14
Tableau 5: Mécanismes antimicrobiens des bactéries lactiques.	19
Tableau 6: Matériel de laboratoire utilisé.....	33
Tableau 7: Interprétation des résultats	43
Tableau 8: Résultats du test ODC	44
Tableau 9: Résultats du test LDC	45
Tableau 10: Résultats du test ADH	45
Tableau 11: comparatif des tests LDC, ODC et ADH (Madigan et al., 2018 ; Prescott et al., 2020)	45
Tableau 12: Dilutions successives préparées à partir de la solution standard.....	51
Tableau 13: Résultat d'observations macroscopiques et microscopiques	57
Tableau 14: Résultat d'identification biochimique classique des bactéries sélectionnées	60
Tableau 15: Interprétation des résultats d'identification biochimique classique des bactéries sélectionnées.....	62
Tableau 16: Résultats de standardisation.	69
Tableau 17: Absorbances à 590 nm des échantillons fermentés dilués (1/40 ^e) pour le dosage indirect... ..	70
Tableau 18: Solutions étalons de MSG et leurs absorbances mesurées à 590 nm	71
Tableau 19: Estimation de la production de GABA (mmol/L) à partir du taux de conversion du MSG (%) par les souches BFH1 à BFH6, sur la base des mesures d'absorbance à 590 nm.....	74

Liste des figures

Figure 1: Formes typiques du matmoura (Bartali, 1987)	26
Figure 2: préparation d'une matmoura souterrain (Bartali et al, 1984)	27
Figure 3: Photos du Matmoura (Mokhtari et al.,2016)	28
Figure 4: Echantillon du blé fermenté récolté de Matmoura	29
Figure 5: décrit le processus d'isolement et d'identification des bactéries lactiques	35
Figure 6: illustre les étapes de fermentation, de production et de dosage du GABA.	36
Figure 7: enchanctions de blé fermenté	36
Figure 8: Les trois solutions mères et ses dilutions décimales (boites à incuber a 44° C)	37
Figure 9: Les trois solutions mères et ses dilutions décimales (boites à incuber a 30° C)	37
Figure 10: Incubation en aérobiose a 44 C°	38
Figure 11: Incubation en aérobiose a 30 C°	38
Figure 12: Incubation en anaérobiose a 44 °C.....	38
Figure 13: Incubation en anaérobiose a 30 °C.....	38
Figure 14: Coloration de GRAM et les observations microscopiques.....	39
Figure 15: Incubation des milieux à T° et pH optimaux en anaérobie , une durée de 7 jours	47
Figure 16: Filtration des milieux fermentés	48
Figure 17: Virage de couleur à la violette	49
Figure 18 : Centrifugation de filtrat à 4500 tours par minute (rpm) pendant 20 minutes	49
Figure 19: 1ml ninhydrine 3 % ajouter au 9 ml surnageants mères	49
Figure 20: Incubation des mélanges dans un bain-marie à une T°entre 90 et 100°C.....	49
Figure 21: Centrifugation de mélange à 10 000 tours par minute pendant 10 minutes	49
Figure 22: Incubation des mélanges dans un bain-marie à une T° entre 90-100 °C.....	50
Figure 23: Surnageants dilués au 1/40 ^e (v/v)	50
Figure 24 : 1ml ninhydrine à 3 % ajouter au 9ml de surnageants dilués au 1/40 ^e (v/v).....	50
Figure 25: : Solution standard	51
Figure 26: étalonnage de spectrophotométrie	51
Figure 27: Série de dilutions de la solution standard de 1/10 ^e au 1/100 ^e	51
Figure 28: Cultures isolées de SM2 et ses dilutions dans une température de 30°C en aérobie.....	53
Figure 29: Cultures isolées de SM1 et ses dilutions dans une température de 30°C en aérobie.....	53
Figure 30: Cultures isolées de SM2 et ses dilutions dans une température de 30°C en aérobie.....	53
Figure 31: Cultures isolées de SM2 et dilution 10-1 a une température de 30°C en anaérobie.	54
Figure 32: Cultures isolées de SM1 et dilution 10-1 a une température de 30°C en anaérobie.....	54
Figure 33: Cultures isolées de SM 3 et dilution 10-1 a une température de 30°C en anaérobie.	54
Figure 34: Cultures isolées de SM1 et ses dilutions dans une température de 44°C en aérobie.....	55

Figure 35: Cultures isolées de SM3 et ses dilutions dans une température de 44°C en aérobie.....	55
Figure 36: Cultures isolées de SM2 et ses dilutions dans une température de 44°C en aérobie.....	55
Figure 37: Cultures isolées de SM2 et dilution 10-1 a une température de 44°C en anaérobie.....	56
Figure 38: Cultures isolées de SM1 et dilution 10-1 a une température de 44°C en anaérobie.....	56
Figure 39: Cultures isolées de SM3 et dilution 10-1 a une température de 44°C en anaérobie.....	56
Figure 40: Schéma de conservation courte durée des bactéries lactiques purifiées	67
Figure 41: Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées.....	68
Figure 42: : histogramme représentant la densité optique (DO600 nm) pour chaque souche bactérienne.	69
Figure 43: Incubation des mélanges dans un bain-marie à une T°entre 90 et 100°C.....	70
Figure 44: Virage de couleur à la violette	70
Figure 45: 1ml ninhydrine 3 % ajouter au 9 ml surnageants mères	70
Figure 46: abs =0,154 (valeur de référence)	71
Figure 47: Courbe d'étalonnage obtenue par réaction du GABA avec la ninhydrine,.....	72
Figure 48: Visualisation comparative des absorbances, du pourcentage de MSG consommé et de la quantité estimée de GABA produite par fermentation.	75
Figure 50: Observation microscopique : Bacille GRAM+ non sporulée	91
Figure 50: Test oxydase et catalase négative	91

Table des Matière

Introduction.....	1
Première partie.....	1
Partie bibliographique	1

Premiere partie

Parie bibliographique

Chapitre I GABA

1 Le GABA (Acide γ -aminobutyrique) :.....	3
1.1 Définition :	3
1.2 Structure chimique :	3
1.3 Propriétés biochimiques :	4
1.3.1 Solubilité et stabilité :	4
1.3.2 Métabolisme :	4
1.3.3 Activité biologique :	4
2 Rôles physiologiques majeurs du GABA chez l'Homme :	5
2.1 Régulation de l'activité neuronale :	5
2.2 Sommeil et rythme circadien :	6
2.3 Réduction de l'anxiété et des émotions négatives :	7
2.4 Développement cérébral :	7
2.5 Fonctions cognitives et plasticité :	7
3 Effets nutritionnels du GABA :	7
4 Applications thérapeutiques du GABA:	8
5 Limites:	9

Chapitre II Les bactéries lactiques

1 Caractéristiques principales :	11
2 Classification taxonomique :	12
2.1 Classification phénotypique traditionnelle :	12

2.2	Révolution taxonomique basée sur la génomique depuis 2017:	13
2.3	Nouveaux genres et implications taxonomiques:	13
2.4	Taxonomie génomique actuelle des bactéries lactiques :	14
3	Critères d'identification classique des bactéries lactiques :	15
3.1	Morphologie cellulaire :	15
3.2	Type de fermentation:	15
3.2.1	Homofermentation (voie EMP) :	15
3.2.2	Hétérofermentation (voie PKP) :	16
3.2.3	Régénération du NAD ⁺ :	16
3.3	Température et pH de croissance :	16
3.4	Caractéristiques biochimiques :	16
4	Activités enzymatiques spécifiques des BL :	17
4.1	Glutamate décarboxylase (GAD) :	17
4.2	Peptidases et protéases :	17
4.3	Glycosidases :	18
4.4	Lipases et estérases :	18
4.5	Phytases :	18
5	Effets probiotiques des bactéries lactiques :	18
5.1	Amélioration de la santé intestinale :	19
5.2	Modulation immunitaire :	19
5.3	Activité antimicrobienne :	19
5.4	Production de vitamines :	20
6	Rôle des bactéries lactiques dans la production du GABA :	21
Chapitre III Blé fermenté Aliment fermenté comme source potentielle de bactéries lactiques		
1	La fermentation :	24
2	Blé fermenté :	26

Deuxième partie

Partie Expérimentale

Chapitre IV Matériels et méthodes

1	Objectif :	32
2	Lieu et période de travail :	32

3	Matériel :	32
3.1	Matériel végétal :	32
3.2	Matériel de laboratoire utilisé :	33
4	Méthodes :	34
4.1	Protocole expérimental :	34
4.2	La préparation des échantillons :	36
4.2.1	Purification et Triage :	36
4.2.2	Préparation de la solution mère et des dilutions décimales :	37
4.3	Analyse microbiologique :	37
4.3.1	L'ensemencement :	37
4.3.2	La purification :	38
4.4	Identification des bactéries :	39
4.4.1	Les observations macroscopiques :	39
4.4.2	Les observations microscopiques :	39
4.4.3	Identification biochimique des bactéries sélectionnées :	40
4.4.4	Culture en batch (fermentation) pour production de GABA :	46

Chapitre V Résultats et discussion

1	Résultat d'analyse microbiologique :	53
1.1	L'ensemencement et la purification :	53
1.2	Identification des bactéries :	57
1.3	Resultats d'identification biochimique classique des bactéries sélectionnées :	60
1.4	Analyse microbiologique des bactéries sélectionnées du blé fermenté (BFH1 à BFH7) :	63
1.5	Discussion :	65
1.6	Conservation des souches :	66
1.7	La production de GABA :	69
1.7.1	Résultats de la densité optique des suspensions bactériennes :	69
1.7.2	Résultat de dosage colorimétrique du GABA par la méthode à la ninhydrine dans les solutions fermentées :	70
1.7.3	Résultat de dosages spectrophotométrique des solutions étalon pour la courbe d'étalonnage :	71
1.7.4	Estimation indirecte de la production de GABA à partir de la consommation du MSG, sur la base des mesures d'absorbance à 590 nm :	72

1.7.5	Analyse quantitative et interprétation :.....	75
	Conclusion générale.....	79
	Références.....	81
	Annexe 1	88
	Annexe 2	91
	Résumé.....	92

Introduction

Dans le contexte actuel d'une recherche accrue de solutions alimentaires naturelles, fonctionnelles et bénéfiques pour la santé humaine, les microorganismes d'intérêt biotechnologique, en particulier les bactéries lactiques, suscitent un intérêt grandissant. Leur utilisation traditionnelle dans la fermentation des aliments est aujourd'hui revisitée à la lumière des avancées scientifiques qui révèlent leur potentiel en tant que sources de composés bioactifs, tels que les acides organiques, les peptides antimicrobiens, ou encore des neurotransmetteurs comme l'acide γ -aminobutyrique (GABA).

Le GABA, principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central chez les mammifères, joue un rôle physiologique fondamental dans la régulation du stress, de l'anxiété, du sommeil et de la pression artérielle. L'intérêt croissant pour ce composé réside dans ses effets bénéfiques démontrés sur la santé mentale et cardiovasculaire, ce qui le place au cœur des préoccupations en matière de nutrition préventive et de bien-être.

De nombreuses recherches ont ainsi été consacrées à l'identification de sources alternatives et naturelles de GABA, parmi lesquelles les bactéries lactiques occuperaient une place de choix, notamment en tant que producteurs biologiques dans les matrices alimentaires fermentées.

Parallèlement, les pratiques traditionnelles de fermentation, largement répandues dans les régions rurales et semi-urbaines, représentent une mine inexploitée de diversité microbienne. Le blé fermenté de type "hamoum", issu de traditions ancestrales de conservation et de valorisation du blé au ALGERIE, constitue une matrice riche et prometteuse pour l'isolement de souches autochtones de bactéries lactiques, cette matrice soumise à des conditions artisanales de fermentation, favorise le développement de communautés bactériennes spécifiques, potentiellement dotées de capacités métaboliques uniques, incluant la production de GABA via la décarboxylation de l'acide glutamique.

C'est dans cette perspective que s'inscrit le présent travail, qui vise à cribler et caractériser les souches de bactéries lactiques capables de produire du GABA, isolées à partir de blé fermenté traditionnel hamoum.

L'objectif est double : d'une part, valoriser une ressource fermentée locale à fort potentiel fonctionnel, et d'autre part, contribuer à l'essor de stratégies biotechnologiques durables pour la production de GABA d'origine naturelle. L'étude implique l'isolement, la purification et l'identification phénotypique de souches bactériennes, suivis d'un criblage biochimique pour évaluer leur aptitude à produire du GABA, ainsi que l'analyse de leurs performances en conditions contrôlées.

Par cette démarche, ce travail s'inscrit pleinement dans le cadre de la recherche actuelle sur les aliments fonctionnels, et met en lumière l'importance du patrimoine fermentaire local comme réservoir d'innovations microbiologiques au service de la santé humaine.

Problématique :

Malgré l'intérêt croissant porté aux aliments fonctionnels et aux composés bioactifs d'origine microbienne, la production naturelle de GABA par des bactéries lactiques reste encore peu exploitée, notamment dans les contextes fermentaires traditionnels. Bien que plusieurs souches de bactéries lactiques aient été identifiées comme productrices de GABA dans des matrices alimentaires fermentées telles que le lait, le soja ou les légumes, les produits céréaliers fermentés artisanaux en particulier le blé fermenté de type hamoum n'ont pas encore été suffisamment étudiés sous cet angle.

Dans ce cadre, plusieurs questions scientifiques et technologiques se posent :

- Existe-t-il dans le blé fermenté de type hamoum une diversité significative de bactéries lactiques capables de produire du GABA ?
- Quelles sont les souches les plus performantes en termes de production de GABA, et quels sont les facteurs environnementaux qui influencent cette biosynthèse ?
- Comment ces souches peuvent-elles être valorisées dans le développement d'aliments fermentés enrichis en GABA ou dans d'autres applications biotechnologiques ?

Ainsi, la problématique centrale de ce travail peut être formulée comme suit :

Dans quelle mesure les bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté traditionnel "hamoum" possèdent-elles la capacité de produire de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), et comment peut-on les cribler, identifier et valoriser pour une application potentielle dans le domaine des aliments fonctionnels ?

Première partie

Partie bibliographique

Chapitre I

GABA

Chapitre I

GABA

1 Le GABA (Acide γ -aminobutyrique) :

1.1 Définition :

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est un acide aminé non protéinogène présent chez les eucaryotes et les procaryotes. Bien qu'il ne soit pas utilisé dans la biosynthèse des protéines, le GABA joue un rôle central dans divers processus biologiques. Chez les mammifères, il agit comme le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Dans les micro-organismes, notamment les bactéries lactiques, le GABA est produit dans le cadre de leur adaptation aux conditions acides (Komatsuzaki et al., 2005; Yao et al., 2023).

Le GABA attire également un intérêt croissant dans les domaines nutritionnel, pharmaceutique et agroalimentaire, en raison de ses effets bénéfiques prouvés sur la santé humaine.

1.2 Structure chimique :

Le GABA est un acide aminé à chaîne linéaire composé de quatre atomes de carbone. Il se distingue des acides aminés standards par la position de son groupe amine sur le carbone γ (carbone 4), d'où son nom.

- ❖ **Nom IUPAC:** Acide 4-aminobutanoïque
- ❖ **Formule brute:** $C_4H_9NO_2$
- ❖ **Poids moléculaire:** 103,12 g/mol
- ❖ **Structure linéaire:** $NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-COOH$

Le GABA est généralement produit par décarboxylation du L-glutamate, une réaction catalysée par l'enzyme glutamate décarboxylase (GAD), qui nécessite le pyridoxal phosphate (coenzyme dérivé de la vitamine B₆) comme cofacteur (Dhakal et al., 2012).

1.3 Propriétés biochimiques :

1.3.1 Solubilité et stabilité :

Le GABA est hautement hydrosoluble, ce qui facilite sa diffusion dans les milieux aqueux biologiques et alimentaires. Il est stable dans des conditions de pH acide à neutre, mais peut se dégrader à des pH basiques ou sous l'effet de fortes températures (Zhao et al., 2022).

1.3.2 Métabolisme :

- ❖ **Synthèse:** catalysée par la glutamate décarboxylase (GAD), qui convertit le glutamate en GABA, avec libération de CO₂.
- ❖ **Dégradation:** dans les cellules animales, le GABA est catabolisé par la GABA-transaminase, produisant le succinique semi-aldéhyde, qui est ensuite oxydé en succinate, un intermédiaire du cycle de Krebs (Petroff, 2002).
- ❖ **Chez les bactéries lactiques,** ce métabolisme participe au maintien du pH intracellulaire, à la tolérance au stress acide, et peut représenter un avantage adaptatif en milieu fermentaire (Yao et al., 2023).

1.3.3 Activité biologique :

Chez les vertébrés, le GABA agit en se fixant à deux types principaux de récepteurs:

- ❖ **GABA_A** : récepteurs ionotropes couplés à des canaux chlorure, produisant une hyperpolarisation neuronale.
- ❖ **GABA_B**: récepteurs métabotropes liés à des protéines G, modulant l'activité des canaux potassiques et calciques.

Ces actions entraînent une réduction de l'excitabilité neuronale, d'où ses effets anxiolytiques, sédatifs, hypotenseurs, et antispasmodiques (Diana et al., 2014).

Tableau 1: compare les deux principaux types de récepteurs du neurotransmetteur GABA

Caractéristique	GABA_A	GABA_B
Type	Ionotrope (canal Cl^-)	Métabotrope (GPCR)
Structure	Pentamérique (5 sous-unités)	Hétérodimère (GABA_B1 + GABA_B2)
Vitesse de réponse	Rapide (millisecondes)	Lente (secondes à minutes)
Mode d'action	Entrée de $\text{Cl}^- \rightarrow$ hyperpolarisation	Sortie de K^+ / Inhibition des canaux Ca^{2+}
Effet	Inhibition synaptique rapide	Inhibition prolongée, modulation de la libération des neurotransmetteurs
Cible pharmacologique	Benzodiazépines, barbituriques, alcool	Baclofène
Localisation	Postsynaptique	Souvent présynaptique
Fonctions	Anxiété, sommeil, anticonvulsivant	Spasticité, dépendances, modulation cognitive

Les récepteurs ionotropes GABA_A et les récepteurs métabotropes GABA_B (Gassmann et al, 2012 ; et Macdonald et al, 2022).

2 Rôles physiologiques majeurs du GABA chez l'Homme :

2.1 Régulation de l'activité neuronale :

GABA agit principalement via deux types de récepteurs :

- **GABA_A** (récepteurs ionotropes): ouverture rapide des canaux chlorure, entraînant une hyperpolarisation du neurone.
- **GABA_B** (récepteurs métabotropes): activation de protéines G, régulant indirectement les canaux ioniques.

Cette inhibition permet :

- Le contrôle de la plasticité synaptique.
- La prévention de l'hyperexcitabilité, essentielle pour éviter les crises épileptiques.

(Olsen & Sieghart, 2009; Macdonald & Olsen, 2022).

2.2 Sommeil et rythme circadien :

GABA joue un rôle central dans la régulation du sommeil en inhibant les systèmes d'éveil dans l'hypothalamus et le tronc cérébral.

- Il est impliqué dans l'initiation et le maintien du sommeil profond (stade NREM).
- Les médicaments favorisant l'activité GABAergique (benzodiazépines, zolpidem) sont largement utilisés comme hypnotiques (*Franks, 2008 ; Luppi et al, 2017*).

Le sommeil NREM (*Non-Rapid Eye Movement*), ou sommeil non paradoxal, est une phase du sommeil qui précède et alterne avec le sommeil REM (Rapid Eye Movement ou sommeil paradoxal).

Il représente environ 75 à 80 % du sommeil total chez l'adulte et se divise en trois sous-stades (selon la classification de l'American Academy of Sleep Medicine, AASM ; 2007).

Tableau 2: comparatif centré sur le rôle du GABA dans les phases du sommeil NREM et REM: (Brown, R. E., et al, 2012; Luppi, P. H., et al, 2017; Peever, J., 2017).

Aspect	Sommeil NREM (Non-REM)	Sommeil REM (Rapid Eye Movement)
Rôle du GABA	GABA est le principal neuromodulateur inhibiteur qui induit et maintient le sommeil NREM. Il agit notamment sur le thalamus et l'hypothalamus pour inhiber les systèmes d'éveil.	Le GABA intervient de manière indirecte dans le sommeil REM en modulant l'équilibre excitation/inhibition au niveau des structures pontiques impliquées dans l'atonie musculaire.
Mécanisme d'action	Activation des récepteurs GABA _a et GABA _b dans les noyaux préoptiques ventrolatéraux (VLPO), inhibant les neurones monoaminergiques (noradrénergiques, sérotoninergiques).	Moins direct : le GABA module les neurones glutamatergiques et cholinergiques dans le tronc cérébral, favorisant les caractéristiques spécifiques du sommeil REM.
Effets observés	Induit le sommeil profond, abaisse le tonus cortical, ralentit l'activité neuronale globale (ondes lentes delta).	Participe à l'atonie musculaire, au contrôle des mouvements oculaires rapides et au traitement onirique.
Contribution fonctionnelle	Favorise la récupération physique, la consolidation de la mémoire déclarative, et l'homéostasie synaptique.	Impliqué dans la consolidation des mémoires émotionnelles et procédurales, et dans la plasticité neuronale.
Modulation pharmacologique	agents GABAergiques (exemple : benzodiazépines, zolpidem) prolongent les stades N2/N3.	Certains médicaments GABAergiques réduisent paradoxalement le sommeil REM (exemple : certains hypnotiques).

2.3 Réduction de l'anxiété et des émotions négatives :

Le système GABAergique module les circuits de l'amygdale, impliqués dans la peur et l'anxiété. Un déficit GABAergique est souvent associé à:

- troubles anxieux généralisés,
- dépression,
- troubles obsessionnels-compulsifs.

Les anxiolytiques agissent généralement en renforçant l'action du GABA (*Luscher et al., 2011; Nuss, 2015*).

2.4 Développement cérébral :

Chez le fœtus et le jeune enfant, le GABA est initialement excitateur avant de devenir inhibiteur, jouant un rôle dans:

- La prolifération neuronale,
- La migration cellulaire,
- La maturation des circuits neuronaux.

(*Ben-Ari et al., 2007; Wang & Kriegstein, 2011*)

2.5 Fonctions cognitives et plasticité :

Le GABA est impliqué dans :

- L'apprentissage et la mémoire (via l'équilibre excitation/inhibition dans l'hippocampe),
- La consolidation mnésique,
- La régulation de l'attention et de la perception sensorielle.

Un déséquilibre GABAergique est observé dans des troubles cognitifs comme la schizophrénie, l'autisme et la maladie d'Alzheimer (*Möhler, 2012; Zhang et al., 2021*).

3 Effets nutritionnels du GABA :

Le GABA (acide γ -aminobutyrique) présente plusieurs effets bénéfiques sur la santé humaine lorsqu'il est administré par voie orale ou sous forme d'aliments fonctionnels enrichis.

- **Effet hypotenseur** : Le GABA permet de réduire la pression artérielle en inhibant l'activité du système nerveux sympathique. Plusieurs études ont démontré une diminution

significative de la tension artérielle après administration de GABA, notamment dans des essais cliniques utilisant du lait fermenté enrichi (Inoue et al., 2003 ; Shimada et al., 2009).

- **Réduction du stress et de l'anxiété** : Par l'activation des récepteurs GABA_A, il contribue à la régulation de l'humeur et à la réduction du stress psychologique (Boonstra et al., 2015 ; Abdou et al., 2006). L'administration orale de GABA a notamment entraîné une réduction des marqueurs du stress chez l'homme.
- **Amélioration du sommeil** : L'ingestion de GABA, en particulier sous forme de compléments alimentaires, a montré des effets positifs sur la qualité du sommeil, notamment une réduction du temps d'endormissement et une amélioration de la durée totale du sommeil (Yamatsu et al., 2016).
- **Effet hypoglycémiant** : Le GABA joue également un rôle dans la régulation du métabolisme glucidique, en stimulant la sécrétion d'insuline et en améliorant la sensibilité à cette hormone, comme observé dans des modèles expérimentaux chez la souris et chez l'homme (Soltani et al., 2011 ; Purwana et al., 2014).
- **Produits enrichis** : De nombreux aliments fermentés sont naturellement riches en GABA, notamment le lait fermenté, les yaourts, certains jus de fruits, le pain, ainsi que les produits à base de soja fermenté (Dhakal et al., 2012 ; Li et al., 2010). On trouve également des suppléments alimentaires de GABA sous forme de capsules, poudres ou boissons fonctionnelles (Boonstra et al., 2015).

4 Applications thérapeutiques du GABA:

Le GABA est largement étudié pour ses effets pharmacologiques et son potentiel thérapeutique dans diverses pathologies neurologiques et psychiatriques.

- **Épilepsie** : Plusieurs antiépileptiques ciblent la voie GABAergique pour inhiber l'excitabilité neuronale excessive. Des molécules telles que la vigabatrine et la gabapentine agissent en augmentant les niveaux synaptiques de GABA ou en modulant ses récepteurs (Treiman, 2001 ; Löscher & Schmidt, 2011).
- **Anxiété et dépression** : Un déficit en GABA est souvent observé chez les patients souffrant de troubles anxieux ou dépressifs. L'utilisation d'agonistes des récepteurs

GABA_A permet d'améliorer les symptômes (Möhler, 2012 ; Cryan & Kaupmann, 2005).

- **Maladie de Parkinson et d'Alzheimer** : La modulation du système GABAergique représente une stratégie prometteuse dans la réduction de l'hyperexcitabilité neuronale observée dans les pathologies neurodégénératives. Elle peut aider à ralentir la progression des atteintes cognitives (Lancôt et al., 2007 ; Schousboe et al., 2014).
- **Troubles du sommeil** : Les hypnotiques comme les benzodiazépines et le zolpidem ciblent les récepteurs GABA_A, facilitant l'endormissement et prolongeant le sommeil (Wafford & Ebert, 2008 ; Holbrook et al., 2000).
- **Hypertension** : Des formulations orales à base de GABA (exemple : bio-GABA) ont été utilisées comme agents naturels pour la réduction de l'hypertension, avec des effets significatifs observés chez l'homme (Inoue et al., 2003 ; Kim et al., 2013).

5 Limites:

Malgré ses effets bénéfiques démontrés, l'absorption orale directe du GABA est fortement limitée par sa faible capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE), réduisant ainsi son efficacité thérapeutique (Boonstra et al., 2015 ; Froestl, 2022).

Afin de surmonter cette limitation, des stratégies innovantes telles que l'utilisation de nanoparticules, de vecteurs lipidiques ou encore de dérivés lipophiles sont actuellement à l'étude pour améliorer la biodisponibilité cérébrale du GABA (Froestl, 2022).

Chapitre II

Les bactéries lactiques

Chapitre II

Les bactéries lactiques

1 Caractéristiques principales :

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes ou chimioorganotrophes ce sont des microorganismes ubiquitaires susceptibles d'être retrouvées dans tous types d'habitat.

Elles occupent des niches écologiques variées, allant du tractus gastro-intestinal humain et différentes surfaces des muqueuses des mammifères aux produits alimentaires fermentés, en passant par les végétaux et les environnements riches en glucides (Axelsson, 2015).

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

Ce sont des bactéries à Gram-positif dont la teneur en guanine et cytosine (GC) est inférieure à 53% ce qui les classe dans les bactéries à faible pourcentage de GC % (Gonzalez et al., 2000) ; non sporulées, **aéro-anaérobies facultatives** ou **anaérobies strictes**, capables de fermenter les sucres pour produire principalement de l'acide lactique.

Elles jouent un rôle fondamental dans la fermentation des aliments, la conservation, la sécurité microbiologique, ainsi que dans la production de composés bioactifs comme le GABA (acide γ -aminobutyrique) (Zheng et al., 2020 ; LeBlanc et al., 2017).

Traditionnellement, leur classification reposait sur des critères **phénotypiques**, **biochimiques** et **physiologiques**, bien avant l'ère des analyses génomiques.

2 Classification taxonomique :

2.1 Classification phénotypique traditionnelle :

Historiquement, les BL étaient classées selon des caractéristiques morphologiques (cocci ou bacilles), physiologiques (type de fermentation, tolérance au sel, température de croissance) et biochimiques (profils enzymatiques, fermentation de sucres).

La classification classique regroupait les bactéries lactiques dans l'ordre des **Lactobacillales** (classe des **Bacilli**, phylum **Firmicutes**).

Les principales familles inclus étaient :

Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Leuconostocaceae et Carnobacteriaceae.

Cette approche avait permis de distinguer plusieurs genres clés, comme récapitulé dans le tableau ci-dessous:

Tableau 3 : Classification traditionnelle basée sur les caractères phénotypiques (Axelsson 2015).

Genre	Forme cellulaire	Type de fermentation	Particularités
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homo- ou hétéro fermentaire	Diversité élevée, rôle en fermentation végétale
<i>Lactococcus</i>	Cocci	Homofermentaire	Important en fromagerie
<i>Streptococcus</i>	Cocci	Homofermentaire	Thermophile, utilisé dans le yaourt
<i>Leuconostoc</i>	Cocci	Hétérofermentaire	Sensible au sel, impliqué en fermentation lactique
<i>Pediococcus</i>	Cocci (tétrades)	Homofermentaire	Résistance à l'acidité, important en vin
<i>Enterococcus</i>	Cocci	Variable	Commensal intestinal, parfois pathogène
<i>Weissella</i>	Cocci/irrégulier	Hétérofermentaire	Environnement végétal, peu tolérant au sel
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Homofermentaire	Environnement froid, aliments d'origine animale

Cette classification, bien qu'opérationnelle en microbiologie industrielle, présentait de nombreuses limitations du point de vue phylogénétique et évolutif (Wuyts et al., 2017).

2.2 Révolution taxonomique basée sur la génomique depuis 2017:

L'introduction des outils de phylogénomique, tels que l'analyse du génome entier, le calcul de la similarité nucléotidique moyenne (ANI) et les arbres phylogénétiques multi-gènes, a permis de revisiter la taxonomie des BL avec une résolution sans précédent.

L'étude fondatrice de Zheng et al. (2020), basée sur l'analyse comparative de plus de 260 génomes de *Lactobacillus*, a conduit à une refonte complète du genre, précédemment polyphylétique et trop hétérogène, cette étude a proposé:

L'introduction des outils de phylogénomique, tels que l'analyse du génome entier, le calcul de la similarité nucléotidique moyenne (ANI) et les arbres phylogénétiques multi-gènes, a permis de revisiter la taxonomie des BL avec une résolution sans précédent.

L'étude fondatrice de Zheng et al. (2020), basée sur l'analyse comparative de plus de 260 génomes de *Lactobacillus*, a conduit à une refonte complète du genre, précédemment polyphylétique et trop hétérogène.

Cette étude a proposé :

- La définition de 23 nouveaux genres (ex. *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Levilactobacillus*),
- La conservation du genre *Lactobacillus* sensu stricto, réduit à une vingtaine d'espèces,
- La fusion des familles Lactobacillaceae et Leuconostocaceae en une seule unité taxonomique cohérente (Zheng et al., 2020).

2.3 Nouveaux genres et implications taxonomiques:

Chaque nouveau genre a été défini selon des critères génomiques (ANI > 94 % intra-genre), écologiques (niche d'isolement), fonctionnels (voie de fermentation, production de bactériocines, etc.) et phylétiques (gènes conservés). Voici quelques exemples:

- *Lacticaseibacillus* : comprend *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*
- *Lactiplantibacillus* : *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum*
- *Levilactobacillus* : *L. brevis*
- *Limosilactobacillus* : *L. fermentum*, *L. reuteri*

- *Furfurilactobacillus*, *Secundilactobacillus*, etc. (Zheng et al., 2020)

Cette nouvelle nomenclature permet une meilleure compréhension des liens évolutifs, facilite la prédiction fonctionnelle et améliore la traçabilité des souches utilisées dans les produits alimentaires et pharmaceutiques.

2.4 Taxonomie génomique actuelle des bactéries lactiques :

Suite aux révisions taxonomiques récentes validées par la LPSN (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature), les bactéries lactiques sont désormais regroupées en familles et genres définis principalement sur des critères phylogénomiques, comme résumé dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4: Classification génomique moderne des bactéries lactiques.

Famille	Genres représentatifs	Caractéristiques taxonomiques principaux	Références
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lacticaseibacillus</i> , <i>Lactiplantibacillus</i> , <i>Fructilactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>	Famille élargie après fusion avec Leuconostocaceae. Comprend de nombreux genres remaniés du groupe <i>Lactobacillus</i> Classique	Zheng et al. (2020)
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactococcus</i>	Cocci homofermentaires, importants en fermentation laitière	Wuyts et al. (2017)
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i> , <i>Weissella</i>	Cocci ou bacilles hétérofermentaires, fermentations végétales et lactées	Zheng et al. (2020)
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i> , <i>Tetragenococcus</i>	Cocci tolérants au sel, présence intestinale, potentiellement pathogènes	Axelsson (2015)
Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium</i> , <i>Alkalibacterium</i>	Bacilles psychrotrophes, présents en environnement marin ou froid.	Axelsson (2015), Zheng et al. (2020)

Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S reste une méthode de référence pour l'identification des bactéries lactiques à l'échelle du genre. Toutefois, des approches plus récentes comme l'analyse comparative de génomes entiers (Whole Genome Sequencing, WGS) et le

calcul de la similarité moyenne de nucléotides (ANI) permettent une classification plus précise et cohérente sur le plan phylogénétique (Makarova et al., 2021 ; Zheng et al., 2020).

3 Critères d'identification classique des bactéries lactiques :

3.1 Morphologie cellulaire :

Les bactéries lactiques se divisent classiquement en deux grands groupes morphologiques en fonction de la forme cellulaire observée au microscope optique :

- **Les cocci**, de forme sphérique ou ovoïde, regroupent les genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. Ces bactéries sont généralement disposées en chaînes ou en tétrades selon l'espèce (Axelsson, 2015 ; Zheng et al., 2020).
- **Les bacilles**, de forme allongée, sont représentés par les genres *Lactobacillus* et *Carnobacterium*. Les cellules peuvent apparaître droites ou légèrement incurvées, isolées ou en chaînes courtes, selon les conditions de culture et l'espèce (Wuyts et al., 2017 ; Zheng et al., 2020).

Cette classification morphologique constitue une première étape importante dans l'identification des bactéries lactiques, bien qu'elle doive être complétée par des analyses biochimiques et moléculaires pour une identification précise (Beresford et al., 2022).

3.2 Type de fermentation:

Les bactéries lactiques possèdent un **métabolisme fermentaire anaérobie facultatif**. Leur principale caractéristique métabolique est la production d'**acide lactique comme métabolite final principal**, à partir de la fermentation des glucides.

3.2.1 Homofermentation (voie EMP) :

Les BL homofermentaires utilisent la voie **Embden–Meyerhof–Parnas (EMP)**, où une molécule de glucose est convertie en deux molécules de lactate, avec génération nette de 2 ATP cette fermentation ne produit pas de CO₂.

- L'équation globale est :



- Ce type de fermentation est observé chez *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus* et certaines souches de *Lactobacillus* dites homofermentaires (*L. delbrueckii*, *L. acidophilus*) (Axelsson, 2015 ; Beresford et al., 2022).

3.2.2 Hétérofermentation (voie PKP) :

Les BL hétérofermentaires utilisent la voie **phosphoketolase (PKP)** dérivée des pentoses phosphates. Une molécule de glucose est métabolisée en une molécule de lactate, une de CO₂ et une d'éthanol ou d'acétate, avec un gain net d'un ATP.

- L'équation globale est :



- Caractéristique des genres *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, et des *Lactobacillus* hétérofermentaires tels que *L. brevis* ou *L. fermentum* (Zheng et al., 2020 ; Wuyts et al., 2017).

3.2.3 Régénération du NAD⁺ :

La régénération du NAD⁺ est essentielle pour permettre la continuité de la glycolyse, dans la fermentation lactique, le NAD⁺ est régénéré par l'action de la **lactate déshydrogénase (LDH)** qui réduit le pyruvate en lactate.

Chez les hétérofermentaires, d'autres voies de régénération existent via la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol ou de l'acétate en acétate phosphoactivé (Axelsson, 2015).

3.3 Température et pH de croissance :

Elles sont capables de croître à des températures inférieures à 5°C et supérieur à 45°C,

- **Mésophiles** : croissent entre 20–40 °C (exemple : *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*).
- **Thermophiles** : croissent entre 45–50 °C (exemple : *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*).

Les BL sont acidophiles, le pH optimal de croissance varie entre 4 et 4,5 mais la prolifération peut s'effectuer à des pH compris entre 3,2 et 9,6 (Caplice et Fitzgerald, 1999).

3.4 Caractéristiques biochimiques :

Les BL **ne possèdent ni nitrate réductase ni cytochrome oxydase** (mis à part quelques rares souches dans des conditions spécifiques) et présentent une **activité protéolytique** ; elles ne produisent ni indole ni sulfure d'hydrogène, et **incapables de fermenter le glycérol** (Dellaglio et al., 1994; Salminen et al., 2004 ; Zhang et Cai, 2014).

Les BL sont des anaérobies facultatifs qui tolèrent l'oxygène mais n'en tirent pas parti pour la respiration.

La majorité des espèces sont catalase-négatives, ce qui signifie qu'elles ne peuvent pas dégrader le peroxyde d'hydrogène via la catalase, bien que certaines possèdent une pseudo-catalase, cette tolérance à l'oxygène est soutenue par des enzymes comme la NADH oxydase ou la peroxydase (Makarova et al., 2021).

Les BL tolèrent des concentrations allant de 2 à 6 % de NaCl, bien que certaines souches extrêmophiles puissent survivre jusqu'à 10 %.

- *Lactiplantibacillus plantarum* et *Levilactobacillus brevis* sont particulièrement résistants, avec une croissance observée jusqu'à 8 % de NaCl (Zang et al., 2020 ; Lee et al., 2021).
- *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus* montrent une tolérance modérée (jusqu'à 4 %), au-delà de laquelle la croissance est inhibée (Vinderola et al., 2019).

Certaines souches de *Enterococcus* et *Tetragenococcus* tolèrent également des concentrations élevées de NaCl (jusqu'à 10 %), ce qui les rend utiles pour les produits fermentés salés (Sun et al., 2022).

4 Activités enzymatiques spécifiques des BL :

Les BL produisent des enzymes métaboliques spécialisées :

4.1 Glutamate décarboxylase (GAD) :

Cette enzyme catalyse la conversion du glutamate en acide γ -aminobutyrique (GABA), un composé bioactif aux effets neuroprotecteurs et hypotenseurs. Des espèces telles que *Lactiplantibacillus plantarum* et *Levilactobacillus brevis* sont connues pour leur haute activité GAD, ce qui en fait des souches d'intérêt pour la formulation de produits fonctionnels enrichis en GABA (Li et al., 2022).

4.2 Peptidases et protéases :

Ces enzymes hydrolysent les protéines, comme les caséines du lait, libérant des peptides bioactifs et des acides aminés essentiels. Ce processus améliore la texture, la saveur et la digestibilité des produits laitiers fermentés comme le fromage et le yaourt (Papadimitriou et al., 2019).

4.3 Glycosidases :

Ces enzymes dégradent des polysaccharides complexes (oligosaccharides végétaux, lactose), facilitant l'assimilation des sucres et réduisant les effets indésirables comme les gaz intestinaux. Elles sont également impliquées dans la libération de composés aromatiques durant la fermentation (Papadimitriou et al., 2019).

4.4 Lipases et estérases :

Bien que moins communes chez les BL, certaines souches possèdent ces enzymes, qui sont impliquées dans l'hydrolyse des triglycérides et des esters, entraînant la libération d'acides gras volatils et de composés aromatiques contribuant à la typicité sensorielle des fromages affinés.

Abriouel et al. (2020) soulignent l'importance de ces activités lipolytiques, notamment chez certaines souches de *Lactobacillus casei* et *Lactocaseibacillus rhamnosus*, dans le développement de la flaveur et de la texture des produits laitiers à longue maturation.

4.5 Phytases :

Certaines BL sont capables de dégrader l'acide phytique dans les céréales, améliorant la biodisponibilité des minéraux comme le fer, le zinc et le calcium, ce qui est particulièrement intéressant pour les aliments d'origine végétale (Abriouel et al., 2020).

Ces activités enzymatiques varient considérablement d'une espèce à l'autre, et même entre souches au sein d'une même espèce, ce qui conditionne leur pertinence pour des applications spécifiques dans les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Selon Papadimitriou et al. (2019), cette variabilité enzymatique explique la nécessité d'un criblage précis et d'une sélection rationnelle des souches de BL en fonction des objectifs technologiques ou nutritionnels visés.

5 Effets probiotiques des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont largement reconnues pour leurs effets probiotiques, définis comme des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte lorsqu'elles sont administrées en quantités adéquates (FAO/WHO, 2002). Parmi ces effets, on note:

5.1 Amélioration de la santé intestinale :

Plusieurs souches comme *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG et *Lactiplantibacillus plantarum* renforcent la barrière intestinale, stimulent la production de mucus, et favorisent l'équilibre du microbiote intestinal (Wells et al., 2021).

5.2 Modulation immunitaire :

Les BL interagissent avec les cellules immunitaires intestinales (cellules dendritiques, lymphocytes T), induisant une réponse anti-inflammatoire et une augmentation des IgA sécrétoires, comme l'ont démontré Makarova et al. (2021).

5.3 Activité antimicrobienne :

Les bactéries lactiques exercent une inhibition directe sur divers pathogènes intestinaux grâce à plusieurs mécanismes moléculaires ont récapitulés dans le tableau suivant :

Tableau 5: Mécanismes antimicrobiens des bactéries lactiques.

Mécanisme antimicrobien	Description	Souches concernées / Exemples	Références
Production d'acide Lactique	Abaissement du pH, créant un environnement défavorable aux pathogènes.	<i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i>	Wells et al. (2021)
Production de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	Molécule oxydante qui perturbe l'ADN et les membranes des bactéries sensibles.	Certaines souches de <i>Lactobacillus</i>	Papadimitriou et al. (2019)
Sécrétion de bactériocines	Peptides antimicrobiens ciblant surtout les bactéries Gram positif (ex. <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i>).	<i>L. lactis</i> (nisine), <i>P. acidilactici</i> (pediocine PA-1)	Öldak et al. (2017), Wells et al. (2021)
Compétition pour les nutriments et l'adhésion	Formation de biofilms, inhibition de l'adhésion des pathogènes, sécrétion d'exopolysaccharides.	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i>	Makarova et al. (2021)
Production de composés antimicrobiens secondaires	Production d'acide acétique, acide formique, phénols, diacétyles qui perturbent les pathogènes.	Diverses espèces de BL	Abriouel et al. (2020)
Production de Reutérine	Composé antimicrobien dérivé du glycérol produit par <i>Limosilactobacillus reuteri</i> ; actif contre bactéries Gram-positif et Gram-négatif, levures, et protozoaires par	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	Abriouel et al. (2020)

	alkylation des groupes thiols essentiels aux pathogènes.		
--	--	--	--

Ces mécanismes agissent souvent en synergie et dépendent fortement des espèces et souches impliquées, des conditions de culture et du substrat. Ils expliquent l'usage croissant des BL comme agents bioconservateurs naturels et comme probiotiques.

5.4 Production de vitamines :

Les bactéries lactiques (BL) sont également reconnues pour leur capacité à synthétiser diverses vitamines hydrosolubles, principalement du complexe B, ce qui contribue à enrichir la qualité nutritionnelle des aliments fermentés.

- **Vitamine B1 (thiamine)** : Certaines souches de *Lactococcus lactis* et *Levilactobacillus brevis* peuvent produire de la thiamine, bien que sa synthèse dépende fortement de la disponibilité des précurseurs dans le milieu (Mäkelä et al., 2022).
- **Vitamine B2 (riboflavine)** : La production de riboflavine a été documentée chez *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, et *Lactococcus lactis*. Ces bactéries peuvent excréter de la riboflavine dans le milieu, améliorant ainsi la teneur en vitamine B2 des aliments fermentés (Zhang et al., 2021 ; Russo et al., 2020).
- **Vitamine B3 (niacine ou acide nicotinique)** : Certaines souches de BL peuvent contribuer à la biosynthèse de niacine à partir du tryptophane, bien que cette voie soit peu exploitée industriellement (Rekha et al., 2023).
- **Vitamine B6 (pyridoxine)** : *Lactiplantibacillus plantarum* et *Limosilactobacillus fermentum* sont capables de produire de faibles quantités de pyridoxine, essentielle au métabolisme des acides aminés (Monteiro et al., 2022).
- **Vitamine B7 (biotine)** : La production de biotine est moins fréquente mais a été observée chez certaines souches de *Lactobacillus delbrueckii* et *Streptococcus thermophilus* (Gomes et al., 2021).
- **Vitamine B9 (folate ou acide folique)** : L'une des vitamines les plus largement produites par les BL. *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, et *Bifidobacterium adolescentis* ont été identifiés comme de bons producteurs de folates, notamment dans des produits laitiers fermentés (Wang et al., 2020 ; Kiouisi et al., 2019).

- **Vitamine B12 (cobalamine)** : Bien que rare, la production de cobalamine a été observée chez certaines souches de *Propionibacterium freudenreichii* (co-cultivées avec BL), ainsi que chez quelques souches atypiques de *Lactobacillus reuteri* (Tuo et al., 2022).

6 Rôle des bactéries lactiques dans la production du GABA :

Les LAB possèdent l'enzyme **glutamate décarboxylase (GAD)**, qui catalyse la décarboxylation du **L-glutamate en GABA**. Cette voie métabolique est activée généralement en réponse à des conditions acides, permettant aux bactéries de réguler leur pH interne (Li, H., Cao et al., 2010).

En monoculture :

Certaines souches de LAB produisent du GABA efficacement lorsqu'elles sont cultivées seules (monoculture) par exemple :

- **Lactobacillus brevis**, **Lactobacillus plantarum**, **Lactobacillus paracasei** et **Lactococcus lactis** sont des souches bien documentées pour leur capacité à produire du GABA (Siragusa et al., 2007 ; Wu & Shah, 2017).
- Des études montrent que la souche **L. brevis NPS-QW-145** peut produire jusqu'à **327 mM de GABA** dans des milieux optimisés (Shi et al., 2014).

En co-culture :

La **co-culture de bactéries lactiques (LAB)** représente une stratégie biotechnologique prometteuse pour améliorer la production de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), la co-culture repose sur les **interactions synergétiques** entre différentes souches ou espèces, pouvant améliorer la viabilité cellulaire, le métabolisme acide-aminé et la tolérance au stress acide, favorable à l'activité de la glutamate décarboxylase (GAD), l'enzyme clé de la biosynthèse du GABA (Li & Cao, 2010).

Dans une étude récente, la co-culture de *Levilactobacillus brevis* et *Lactiplantibacillus plantarum*, isolées d'un substrat végétal, a permis une augmentation significative de la production de GABA (jusqu'à 35 mg/L) par rapport aux cultures simples (Chen et al., 2023).

Levilactobacillus brevis, une souche non-protéolytique, a montré une production améliorée de GABA (jusqu'à 4,8 g/L) lorsqu'elle est co-cultivée avec *Streptococcus thermophilus* en présence de cystéine dans un substrat laitier. *S. thermophilus*, en tant que bactérie

protéolytique, facilite la libération de glutamate à partir de protéines laitières, substrat direct de la GAD (Wu, Q et al ; 2015).

Chapitre III

Blé fermenté

**Aliment fermenté comme source
potentielle de bactéries lactiques**

Chapitre III

Blé fermenté

Aliment fermenté comme source potentielle de bactéries lactiques

1 La fermentation :

La fermentation constitue l'une des plus anciennes méthodes de transformation des denrées alimentaires utilisées par l'humanité (Caplice & Fitzgerald, 1999). Les aliments fermentés se définissent comme des produits ayant subi l'action de microorganismes spécifiques dont les enzymes transforment les macromolécules notamment les polysaccharides, les protéines et les lipides en composés non toxiques, tout en générant des arômes, des saveurs et des textures appréciées des consommateurs (Steinkraus, 1997 ; Chacko et al., 2010). Ces produits connaissent un regain d'intérêt au cours des dernières décennies, en raison de leur caractère traditionnel, de leur diversité, ainsi que de leurs propriétés organoleptiques remarquables (Bonnarme, 2011).

Plusieurs microorganismes peuvent participer à la fermentation des aliments tels que les bactéries, les moisissures et les levures. Les genres les plus rencontrés sont respectivement : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acetobacter*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Saccharomyces* et *Candida* (Steinkraus, 1997 ; Caplice et Fitzgerald, 1999).

Deux types de fermentation peuvent affecter les aliments :

La fermentation spontanée résultant de l'action des microorganismes présents dans la matière première.

La fermentation contrôlée résultant de l'action des microorganismes sélectionnés (cultures starters) selon Blandino *et al.*, 2003 ; Yao *et al.*, 2009 ; Tamang et Kailasapathy, 2010).

La fermentation des céréales s'effectue systématiquement après une phase d'hydratation préalable des grains (FAO/WHO, 2005). Ce processus est généralement dominé par une fermentation de type lactique, favorisée par la présence de bactéries lactiques naturellement

présentes sur les grains ou dans l'environnement (Yao et al., 2009 ; Tamang & Kailasapathy, 2010). Toutefois, cette fermentation peut être compromise par la contamination fongique, laquelle entraîne des altérations physiques notables telles que des changements d'aspect, de goût ou d'odeur, ainsi que des modifications biochimiques affectant la qualité nutritionnelle des aliments. De nombreuses espèces de moisissures, notamment celles appartenant au genre *Aspergillus* fréquemment retrouvées dans l'air, le sol ou sur les cultures sont capables de produire et de libérer des mycotoxines potentiellement toxiques pour la santé humaine (Bhanja et al., 2009).

La fermentation joue un rôle fondamental dans la biopréservation des denrées alimentaires, principalement grâce à la production d'une large gamme de métabolites antimicrobiens par le microbiote fermentaire, en particulier les bactéries lactiques (BL). Parmi ces composés, on retrouve les acides organiques, le dioxyde de carbone (CO₂), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le diacétyle, l'acide phénylacétique, les dipéptides cycliques, les bactériocines, la reutéline et divers acides gras, qui peuvent agir de manière synergique au sein d'écosystèmes alimentaires complexes pour inhiber les microorganismes pathogènes et prévenir la détérioration des aliments (Corsetti et al., 2015).

Certaines espèces de BL, isolées à partir de céréales fermentées et appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*, sont reconnues pour leur capacité à produire des substances aux propriétés antibactériennes (Zacharof & Lovitt, 2012) et antifongiques (Crowley et al., 2013 ; Bianchini, 2015).

Par ailleurs, ces bactéries se distinguent également par leur aptitude à fixer certaines mycotoxines et à inhiber la croissance de moisissures toxigènes, notamment grâce à l'abaissement du pH induit par leur activité fermentaire et à la production de composés de faible poids moléculaire. Les acides organiques produits diffusent à travers la membrane des champignons, libérant des ions hydrogène qui provoquent une acidification intracellulaire.

Ce phénomène perturbe l'intégrité membranaire, augmente la perméabilité de la membrane plasmique et désactive le gradient électrochimique des protons, conduisant finalement à la mort cellulaire des microorganismes fongiques (Ryma Merabti, 2015).

Les céréales constituent des substrats particulièrement adaptés au développement de divers microorganismes probiotiques, favorisant ainsi la production d'aliments fermentés à visée

fonctionnelles. Plusieurs produits traditionnels fermentés à base de céréales, tels que le *togwa*, *bushera*, *mahewu*, *ben-saalga*, *boza* ou encore *pozol*, illustrent ce potentiel en tant que vecteurs naturels de probiotiques (Vasudha & Mishra, 2012).

Le microbiote associé aux céréales fermentées joue un rôle clé dans l'enrichissement nutritionnel, en particulier en augmentant la teneur et la biodisponibilité de plusieurs vitamines hydrosolubles, notamment celles du groupe B, telles que la thiamine (B1), la riboflavine (B2), l'acide pantothénique (B5), le pyridoxal (B6), la biotine (B7) et la cyanocobalamine (B12).

Une étude menée par Ekinici (2005) a mis en évidence une élévation significative des concentrations en riboflavine (B2), niacine, acide pantothénique (B5), ainsi qu'en acide ascorbique et folique, dans le *tarhana*, une préparation fermentée à base de céréales originaire de Turquie.

Par ailleurs, le processus de fermentation favorise une acidification du milieu, créant des conditions propices à l'action enzymatique sur les phytates des composés antinutritionnels présents dans les céréales qui complexent les protéines et les cations multivalents tels que le fer, le zinc, le calcium et le magnésium. La dégradation des phytates au cours de la fermentation permet ainsi d'accroître la solubilité et donc la biodisponibilité de ces minéraux essentiels (Kamal-Eldin, 2012).

2 Blé fermenté :

En Algérie, le blé était historiquement conservé dans des silos souterrains appelés *matmoura* (**figure 1**) suite à l'infiltration accidentelle des eaux de précipitation dans la

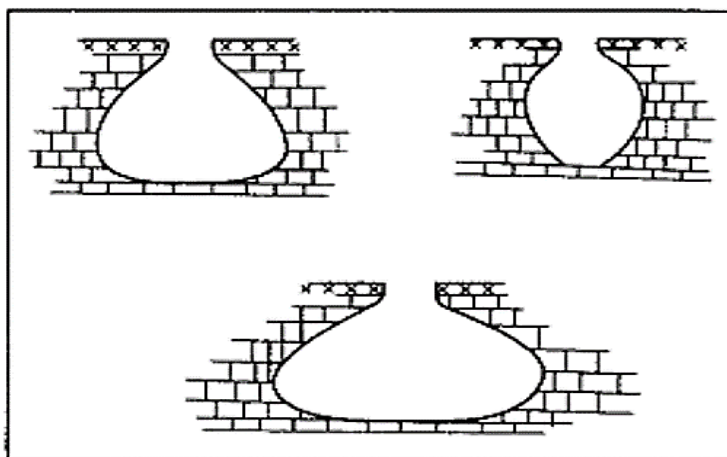


Figure 1: Formes typiques du matmoura (Bartali, 1987)

matmoura,

Les grains de blé humidifiés ou inondés en périphérie et en profondeur du silo, subissent une fermentation spontanée.

La présence d'humidité, de température non contrôlée et l'absence d'air crée dans la *matmoura*, engendrent les phénomènes de fermentation d'origine microbienne qui peuvent durer plusieurs années ($\leq$ neuf années) (**figure 3**). Le goût du blé fermenté est alors découvert et entré dans les habitudes alimentaires pour la fabrication de pain de blé fermenté ou de couscous *lemzeiet*, *elmechroub* ou encore *hamoum* (Mokhtari, 2016). Ce blé est caractérisé par une variété de saveurs, de textures et d'arômes particuliers très convoités par les consommateurs des régions spécifiques (Bekhouché *et al.*, 2013).



Figure 2: préparation d'une matmoura souterrain (Bartali et al, 1984)

Les méthodes de stockage des céréales exigent un contrôle de plusieurs facteurs, notamment la température et l'humidité, afin d'assurer une conservation optimale des grains (Nique, 2006). Parmi les techniques traditionnelles, le stockage souterrain représente une pratique ancestrale largement adoptée pour la constitution de réserves alimentaires à usage domestique, communautaire ou commercial (Bartali et al., 1989).

Cette méthode présente de nombreux avantages : elle permet de maintenir le blé à une température relativement stable, avoisinant les 20 °C, dans un environnement confiné et pauvre en oxygène (anaérobiose), ce qui limite considérablement la prolifération de parasites. Elle offre également une bonne protection contre les variations climatiques et environnementales.

De plus, cette technique est économiquement avantageuse en raison de son faible coût et repose sur l'utilisation de matériaux locaux ainsi que sur un savoir-faire traditionnel, transmis de génération en génération (Bartali et al., 1989).

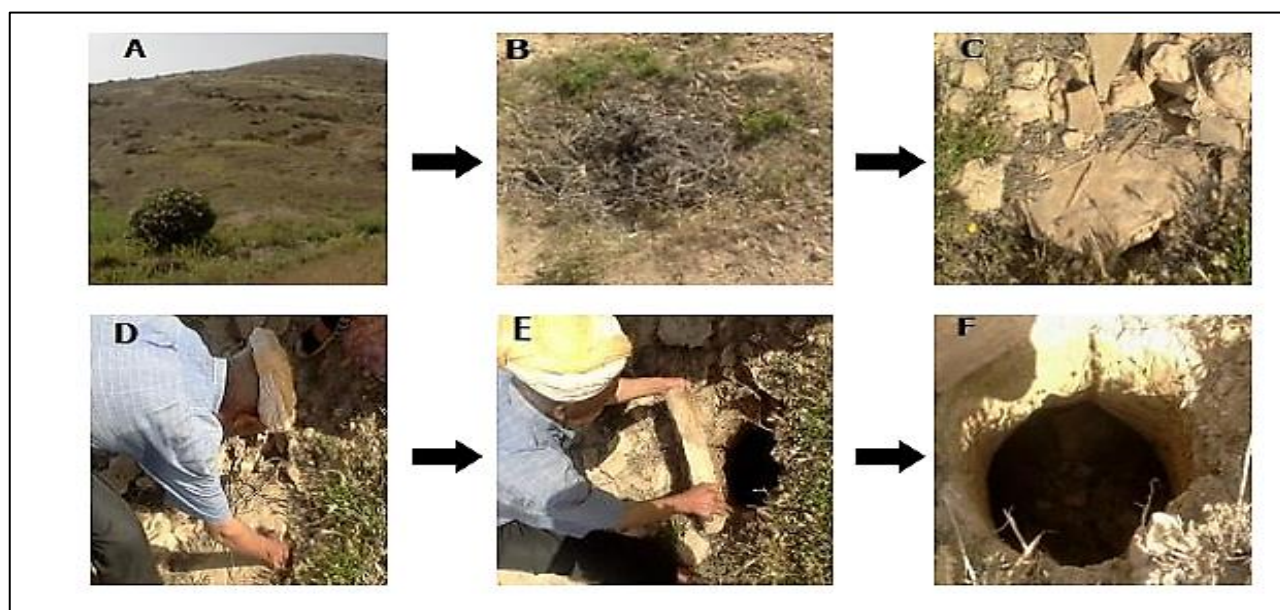


Figure 3: Photos du Matmoura (Mokhtari et al., 2016)

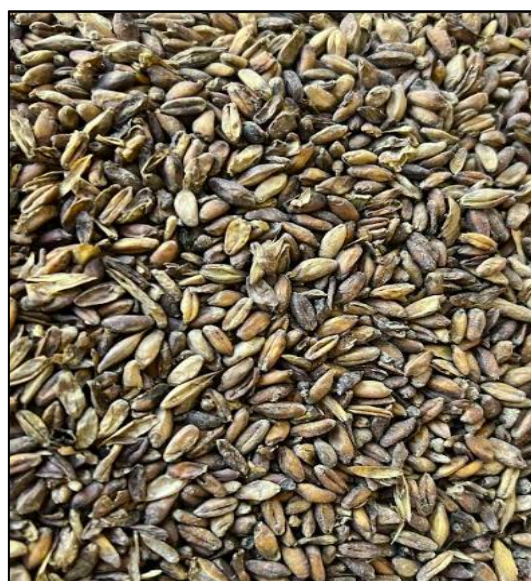


Figure 4: Echantillon du blé fermenté récolté de Matmoura

Deuxième partie

Partie Expérimentale

Chapitre IV

Matériels et méthodes

Chapitre IV

Matériels et méthodes

1 Objectif :

Les objectifs de cette étude se basent autour des points suivants :

- Isolement des bactéries lactiques à partir de différents échantillons de blé fermenté traditionnel type *hamoum*.
- L'étude des caractéristiques phénotypiques, physiologiques et biochimiques des isolats.
- Criblage des bactéries lactiques productrices de GABA.

2 Lieu et période de travail :

Le travail expérimental a été réparti en deux étapes, réalisées dans deux laboratoires de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret.

L'expérimentation a été réalisée durant la période de 14 Avril au 04 Juin 2025.

Au niveau de laboratoire de microbiologie : Isolement et identification phénotypiques et biochimiques de certaines bactéries lactiques impliquées dans la fermentation du milieu M17 enrichie en MSG pour produire le GABA

Au niveau de laboratoire de biochimie : Dosage colorimétrique du GABA dans les solutions fermentées par la méthode à la ninhydrine

3 Matériel :

3.1 Matériel végétal :

Le choix du matériel végétal repose sur plusieurs critères, parmi lesquels :

Le premier critère ayant motivé le choix du *Hamoum* réside dans sa richesse naturelle en microorganismes vivants, qui favorise le processus de fermentation spontanée.

Le second critère consiste à mettre en avant le *Hamoum*, considéré comme un aliment trésor encore méconnu du grand public. Ce choix se justifie par le fait que cette variété de blé dur est largement consommée dans les zones rurales, mais demeure peu étudiée par rapport à d'autres céréales.

Le troisième critère concerne les propriétés médicinales attribuées au *Hamoum*. En effet, ces variétés présentent une haute valeur nutritionnelle, bénéfique notamment pour les personnes souffrant de cancer, de diabète ou de troubles digestifs. De plus, sa composition riche en micro-organismes vivants, favorise une fermentation naturelle.

Le *Hamoum* utilisé dans cette étude a été récolté dans la commune de TIDDA, située dans la wilaya de Tiaret, durant la période d'octobre 2024 après un stockage de 7ans dans la matmoura. Le choix de cette localité s'explique par la forte disponibilité de cette variété de blé fermenté sélectionnée comme source potentielle pour cribler les bactéries lactiques productrices de GABA.

Le *Hamoum* récolté a été divisé en trois échantillons distincts ont été conservés à l'obscurité dans un emballage alimentaire au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à son utilisation.

3.2 Matériel de laboratoire utilisé :

L'ensemble des équipements et matériels laborantins mobilisés pour la réalisation de ce travail expérimental est détaillé dans le tableau suivant :

Tableau 6: Matériel de laboratoire utilisé

Appareillage	Les milieux de culture	Verreries	Produits chimiques Biochimique et microbiologique
--------------	------------------------	-----------	---

Étuves 30°C, 44°C Réfrigérateur Bain-marie Autoclave Balance électronique Bec Bunsen Microscope Optique Spectrophotométrie Agitateur magnétique chauffant PH mètre Vortex Centrifugeuse Agitateur	Gélose MRS Bouillon M17 Milieux : TSE TSI Mannitol mobilité Citrate de Simmons Clarck &lubs Shubert cloche LDH, ODC et ADH	Boîtes de Pétri Tubes à essai Bichers Pipettes pasteur Erlenmeyers Flacons stériles Micropipettes Éprouvettes gradués Anse de platine Porteurs des tubes Lames et lamelles Entonnoirs Fiole jugs Spatules Seringues Boites de Pétri Pipette Pasteur Dessiccateurs	Alcool Éthanol Violet de gentiane Fuschine Lugol Bleu de méthylène Eau distillée MSG Papier absorbant H ₂ O ₂ peroxyde d'hydrogène Disque Oxydase Disque ONPG Glycérol Lait écrémé TCA Ninhydrine
---	---	--	---

4 Méthodes :

4.1 Protocole expérimental :

L'ensemble des étapes expérimentales suivies dans ce travail est synthétisé dans les figures 1 et 2.

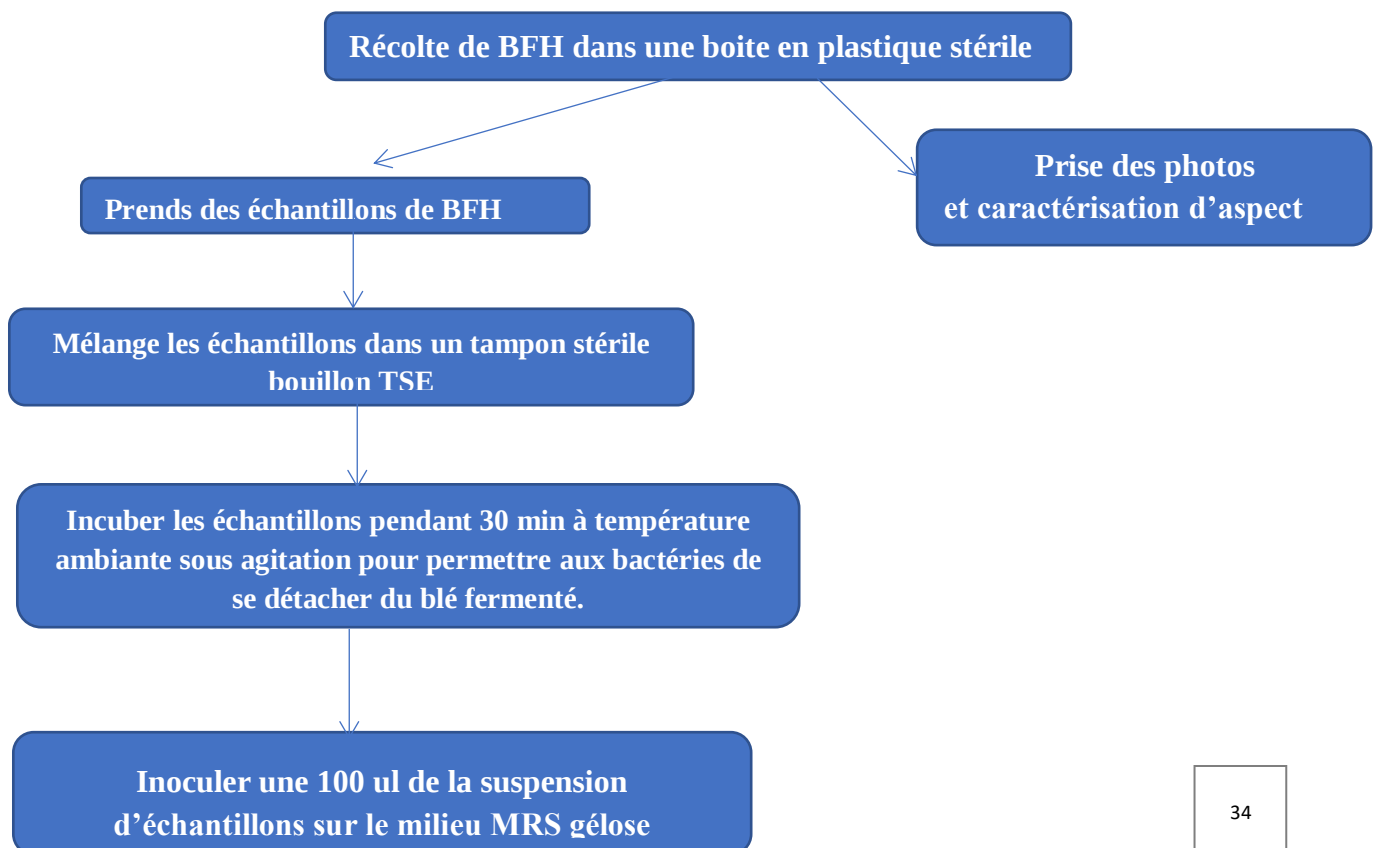


Figure 5: décrit le processus d'isolement et d'identification des bactéries lactiques

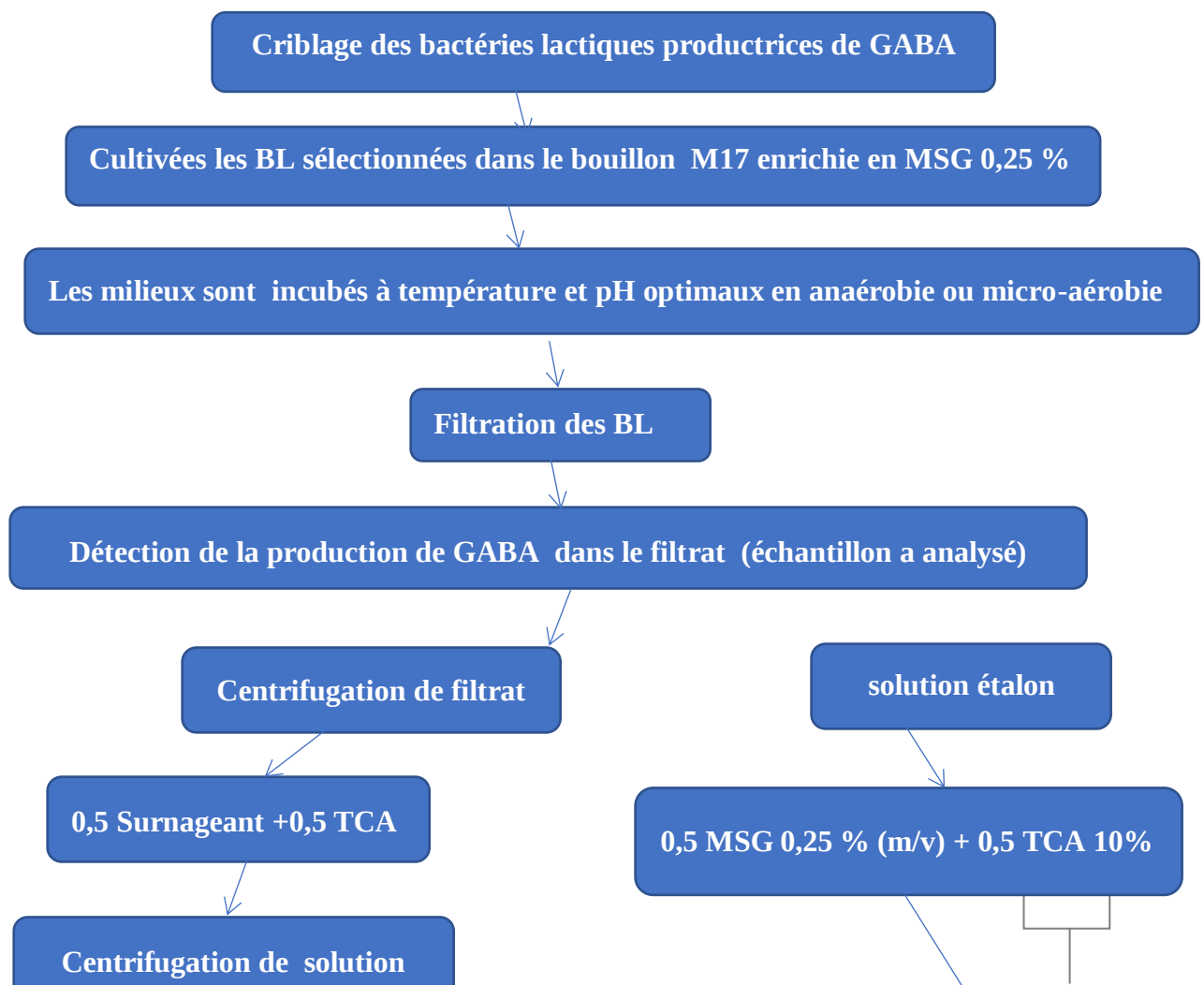


Figure 6: illustre les étapes de fermentation, de production et de dosage du GABA.

4.2.1 Purification et Triage :

Après purification initiale, l'échantillon représentatif a été trié et soigneusement homogénéisé, puis subdivisé en trois fractions distinctes à des fins d'analyse.

Chaque fraction a été transférée dans un flacon stérile en verre d'une capacité de 500 mL, puis conservée à basse température (4 °C) afin de préserver l'intégrité microbiologique jusqu'à leur utilisation ultérieure.



Figure 7: enchantions de blé fermenté

4.2.2 Préparation de la solution mère et des dilutions décimales :

La préparation des dilutions commence par la réalisation de la solution mère, obtenue en ajoutant 1 g de blé fermenté dans 9 ml de bouillon TSE stérile, suivie d'une agitation au vortex pendant 30 minutes afin de favoriser le détachement des bactéries de grain de blé fermenté.

À partir de cette solution, des dilutions décimales successives sont effectuées en transférant 1 ml de la dilution précédente dans 9 ml de bouillon TSE stérile, jusqu'à atteindre une dilution finale de 10^{-3} . La même procédure est appliquée aux deux autres échantillons analysés.

4.3 Analyse microbiologique :

4.3.1 L'ensemencement :

Une analyse microbiologique qualitative a été réalisée en ensemencement par inondation, 100µl de la solution mère et les différentes dilutions ont été ensemencés sur la surface des milieux de culture sélectif approprié solide MRS (gélose préalablement préparée) de manière à



Figure 8: Les trois solutions mères et ses dilutions décimales (boîtes à incuber à 44° C)



Figure 9: Les trois solutions mères et ses dilutions décimales (boîtes à incuber à 30° C)

recouvrir toute la surface dans des conditions d'asepsie.

Les cultures sur MRS ont été incubées à 30°C et 44°C, sont placées en aérobiose et en anaérobiose (dans des dessiccateurs avec une bougie pour réduire partiellement la pression en



Figure 10: Incubation en aérobiose à 44 °C



Figure 11: Incubation en aérobiose à 30 °C



Figure 12: Incubation en anaérobiose à 44 °C



Figure 13: Incubation en anaérobiose à 30 °C

O₂). Une appréciation qualitative a été faite après 24 et 48h d'incubation.

4.3.2 La purification :

Les colonies présentant un isolement morphologique net ont été sélectionnées en vue de leur purification sur gélose MRS (de Man, Rogosa & Sharpe), un milieu de culture enrichi couramment utilisé pour favoriser la croissance des bactéries lactiques.

La purification a été réalisée selon la méthode classique des stries en boîte de Petri, sous conditions aseptiques, par repiquages successifs permettant d'isoler des colonies issues d'une seule cellule.

Cette technique est essentielle pour éliminer les microorganismes contaminants et garantir l'obtention de souches pures, condition préalable à toute caractérisation phénotypique ou moléculaire.

Le processus a été répété jusqu'à l'obtention de colonies homogènes en morphologie et en couleur, indicatrices d'une culture clonale.

4.4 Identification des bactéries :

L'identification des souches bactériennes repose sur une approche intégrée combinant des observations macroscopiques et microscopiques.

4.4.1 Les observations macroscopiques :

Effectuées sur des milieux solides tels que la gélose nutritive ou MRS, permettent de caractériser les colonies selon plusieurs critères : forme, taille, couleur, relief, bordure, coulure, opacité et texture...etc. Ces données fournissent des indices importants sur la nature et la diversité des bactéries isolées (Prescott et al., 2020).

4.4.2 Les observations microscopiques :

4.4.2.1 Examen à l'état frais :

La technique de l'état frais est une méthode d'observation microscopique qui permet l'examen direct de bactéries vivantes sans coloration préalable. Réalisée au microscope optique avec un objectif à immersion sèche (x40), elle permet d'évaluer des caractéristiques physiologiques comme la motilité bactérienne, utile notamment pour différencier les espèces mobiles des espèces immobiles (Prescott et al., 2020).

4.4.2.2 Coloration de GRAM :

Les observations microscopiques après coloration différentielle, en particulier la coloration de Gram, permettent de distinguer les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif en fonction de la composition et de la structure de leur paroi cellulaire, notamment la teneur en peptidoglycane. Cette méthode fournit également des données précieuses sur la morphologie bactérienne (cocci, bacilles), ainsi que sur leur agencement (isolés, en chaînes, en amas),



Figure 14: Coloration de GRAM et les observations microscopiques

facilitant ainsi leur classification préliminaire (Madigan et al., 2018 ; Prescott et al., 2020).

4.4.3 Identification biochimique des bactéries sélectionnées :

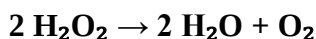
L'identification biochimique des souches bactériennes isolées repose sur la mise en œuvre de tests métaboliques spécifiques visant à caractériser leurs activités enzymatiques et capacités fermentaires.

Ces analyses permettent de déterminer le profil biochimique de chaque souche, en évaluant notamment l'utilisation de différents substrats.

L'ensemble de données contribue à l'orientation taxonomique des isolats et à leur identification à l'espèce ou au genre (Madigan et al., 2018 ; Prescott et al., 2020) :

- **Test de la catalase :**

Repose sur la mise en évidence de l'activité enzymatique de la catalase, une enzyme intracellulaire capable de catalyser la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en dioxygène (O_2), selon la réaction suivante :



Procédure : le test est réalisé en déposant une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2 à 3 %) sur une lame de microscope propre, puis en y ajoutant une petite quantité de biomasse bactérienne (prélevée à partir d'une culture fraîche).

Interprétation des résultats :

- **Catalase positive (catalase +) :** apparition immédiate d'effervescence (formation de bulles de dioxygène) indiquant la présence de l'enzyme catalase.
- **Catalase négative (catalase -) :** absence de production de bulles, traduisant l'absence d'activité catalasique.
- **Test de l'oxydase**

Le test de l'oxydase permet de détecter la présence de la cytochrome c oxydase, une enzyme clé de la chaîne respiratoire chez certaines bactéries aérobies. Cette enzyme catalyse l'oxydation d'un réactif (N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénylènediamine), provoquant une coloration bleu-violet en cas de résultat positif.

Procédure : une colonie bactérienne est déposée sur un disque imprégné de réactif. L'apparition d'une teinte bleue à violette en moins de 60 secondes indique un résultat positif (oxydase +), tandis que l'absence de coloration indique un résultat négatif (oxydase -).

Ce test est couramment utilisé pour différencier les bactéries Gram négatif oxydase positives (exemple : *Pseudomonas*) des entérobactéries oxydase négatives (exemple : *Escherichia coli*).

- **Test à l'ONPG (ortho-nitrophényl- β -D-galactopyranoside) :**

Le test ONPG est un essai biochimique utilisé pour la mise en évidence directe de l'activité β -galactosidase, une enzyme intracellulaire impliquée dans l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose.

Le substrat chromogène utilisé ONPG est une molécule incolore qui, en présence de β -galactosidase, est hydrolysée en galactose et ortho-nitrophénol, ce dernier étant de couleur jaune citron et soluble dans l'eau.

La procédure consiste à imprégner un disque ONPG avec une suspension bactérienne dense, suivie d'une incubation à 37 °C pendant environ 30 minutes.

Lecture des résultats :

- **Test ONPG positif** : apparition d'une coloration jaune citron, signe de production de β -galactosidase.
- **Test ONPG négatif** : absence de coloration, indiquant une non-production de cette enzyme.

- **Test de fermentation du mannitol et évaluation de la mobilité bactérienne :**

Le mannitol, polyol obtenu par réduction du D-fructose, subit une fermentation intracellulaire qui libère du fructose, métabolisé ensuite vers des acides organiques à chaîne courte, entraînant une acidification visible du milieu.

Une colonie bactérienne isolée est inoculée par piqûre centrale dans un milieu semi-solide contenant du mannitol et un indicateur de pH (exemple. Rouge de phénol). Ce test évalue simultanément la capacité de fermentation du mannitol et la mobilité bactérienne.

Interprétation des résultats :

- **Mobilité** : la présence de stries latérales autour de la ligne d'ensemencement indique une mobilité active (bactéries flagellées).

➤ **Fermentation du mannitol** : un virage de la couleur du milieu du rouge au jaune signale la production d'acides par fermentation du mannitol, indiquant une réaction mannitol-positive. En l'absence de changement de couleur, la souche est considérée mannitol-négative.

- **Test du citrate de Simmons**

Le test du citrate de Simmons permet d'évaluer la capacité d'une souche bactérienne à utiliser le citrate comme unique source de carbone. Ce métabolisme implique la présence de la citrate perméase, une enzyme de transport facilitant l'absorption du citrate extracellulaire.

Procédure

À l'aide d'une anse de platine stérile, une colonie bactérienne isolée est prélevée et ensemencée en stries fines à la surface inclinée du milieu de citrate de Simmons. L'incubation est effectuée à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

Interprétation des résultats :

- **Test positif** : croissance bactérienne accompagnée d'un virage de la couleur du milieu de vert à bleu, indiquant une alcalinisation due à la production de sous-produits basiques (comme l'ammoniac) lors de l'utilisation du citrate.
- **Test négatif** : absence de croissance et conservation de la coloration verte, traduisant l'incapacité de la souche à métaboliser le citrate.

- **Test TSI (Triple Sugar Iron Agar)**

Le milieu TSI est un milieu différentiel semi-solide qui permet d'évaluer simultanément plusieurs caractéristiques biochimiques des bactéries entériques. Il renseigne sur la fermentation de trois sucres (glucose, lactose, saccharose), la production d'hydrogène sulfuré (H_2S), et la génération de gaz (CO_2/H_2).

Composition et principes :

Le TSI contient une faible concentration de glucose (0,1 %) et des concentrations plus élevées de lactose (1 %) et saccharose (1 %), ainsi que du thiosulfate de sodium (source de soufre) et du fer (détecteur d' H_2S). Un indicateur de pH (rouge de phénol) permet de détecter l'acidification du milieu liée à la fermentation.

À l'aide d'une anse de platine stérile, on procède à une piqûre verticale du culot du tube, suivie

d'un ensemencement en stries sur la pente du milieu incliné. Les tubes sont ensuite incubés à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

Interprétation des résultats :

Tableau 7: Interprétation des résultats

Résultat observé	Interprétation
Culot jaune	Fermentation du glucose uniquement (acidification transitoire du culot)
Culot rouge (inchangé)	Pas de fermentation du glucose
Pente jaune	Fermentation du lactose et/ou saccharose
Pente rouge groseille	Pas de fermentation du lactose ni du saccharose (milieu alcalinisé par désamination des acides aminés)
Noircissement au niveau du culot	Production de H ₂ S, visible par la formation de sulfure de fer noir
Bulles, fissures, soulèvement du culot	Production de gaz (CO ₂ , H ₂) lors de la fermentation

- **Milieu RM-VP (bouillon de Clark et Lubs) :**

Le bouillon RM-VP (Rouge Méthyle – Voges-Proskauer), également connu sous le nom de bouillon de Clark et Lubs, est un milieu liquide utilisé pour l'étude des voies fermentaires du glucose chez les bactéries. Il permet notamment de différencier les bactéries produisant des acides stables (voie de fermentation mixte acide) de celles produisant des produits neutres (voie du 2,3-butanediol).

Ce test est particulièrement utile pour l'identification des membres de la famille des Enterobacteriaceae, qui sont des bacilles Gram négatif, oxydase négative, ainsi que d'autres bacilles à Gram négatif d'origine entérique (Joffin & Leyrol, 2006 ; Dellarras, 2007).

Procédure :

Une suspension bactérienne dense est ensemencée dans des tubes contenant le bouillon de Clark et Lubs. Après incubation à 37 °C pendant 48 à 72 heures, deux tests distincts sont réalisés :

- Test au rouge de méthyle (RM) : permet de détecter l'acidification forte du milieu par la fermentation du glucose en acides stables (acide lactique, acide formique...). Un virage au rouge après ajout de quelques gouttes d'indicateur (rouge de méthyle) indique un test positif.
- Test de Voges-Proskauer (VP) : détecte la formation de produits neutres tels que l'acétoïne. Après ajout de réactifs spécifiques (alpha-naphtol puis KOH), une coloration rouge indique un résultat positif (Joffin & Leyrol, 2006 ; Dellarras, 2007).

Interprétation partielle du milieu seul (sans ajout de réactifs) : L'utilisation du glucose par certaines bactéries peut entraîner une acidification spontanée du milieu, observable par un virage de la couleur au jaune, signalant la production d'acides organiques.

- **Test de l'ornithine décarboxylase (ODC) :**

L'ornithine décarboxylase est une enzyme inductible impliquée dans le métabolisme des acides aminés. Elle catalyse la décarboxylation de l'ornithine, entraînant la formation de putrescine, une amine biogène.

Ce produit métabolique provoque une alcalinisation du milieu, perceptible par un virage de l'indicateur de pH (généralement le pourpre de bromocrésol) vers le violet (Prescott et al., 2020).

- **Conditions de lecture optimales :**

Incubation à 37 °C pendant 18 à 48 h, parfois jusqu'à 4 jours selon la souche.

Le test doit être lu en absence d'oxygène (milieu bouché) car l'activité de l'ODC est souvent anaérobie-induite (l'ornithine décarboxylase est stimulée uniquement ou préférentiellement en absence d'oxygène).

Ensemencement avec une culture fraîche (Prescott et al., 2020).

Résultats du test ODC

Tableau 8: Résultats du test ODC

Aspect du milieu après incubation	Interprétation
Violet (alcalin)	Test positif : la bactérie possède l'ornithine décarboxylase. L'ornithine a été transformée en putrescine, ce qui a élevé le pH du milieu.
Jaune (acide)	Test négatif : absence de décarboxylation. La fermentation du glucose a produit des acides, abaissant le pH.
Jaune en bas, violet en surface	Test négatif ou douteux : possible alcalinisation superficielle, souvent due à l'oxygène (milieu aérobie en surface). Test à répéter en assurant une atmosphère anaérobie (tube bien bouché, parfois avec paraffine).

- **Test de la lysine décarboxylase (LDC) :**

La lysine décarboxylase est une enzyme inductible qui catalyse la décarboxylation de la lysine, un acide aminé basique, en cadavérine, une amine biogène. Cette réaction libère du dioxyde de carbone (CO_2) et entraîne une alcalinisation du milieu détectable grâce à un indicateur de pH (généralement le pourpre de bromocrésol).

Résultats du test LDC :

Tableau 9: Résultats du test LDC

Apparence du milieu	Interprétation
Violet	Test positif : production de cadavérine, pH alcalin
Jaune	Test négatif : absence de décarboxylation, pH acide
Jaune en bas, violet en haut	Test négatif ou douteux : lecture prématurée ou oxydation en surface

- **Test de l'arginine dihydrolase (ADH) :**

L'arginine dihydrolase (ou arginine dihydrolase system) est une enzyme inductible qui catalyse la dégradation de l'arginine par une voie enzymatique en plusieurs étapes, conduisant à la formation d'amines (notamment l'ornithine) et d'ammoniac (NH_3). Ces produits métaboliques alcalinisent le milieu, ce qui permet la détection de l'activité enzymatique par un changement de pH.

Résultats du test ADH

Tableau 10: Résultats du test ADH

Apparence du milieu	Interprétation
Violet (alcalin)	Test positif : l'arginine est hydrolysée, le pH augmente par libération d'ammoniac.
Jaune (acide)	Test négatif : le glucose a été fermenté mais l'arginine n'a pas été hydrolysée.
Incolore ou intermédiaire	Résultat douteux : à confirmer par un test complémentaire ou prolongation d'incubation.

Tableau 11: comparatif des tests LDC, ODC et ADH (Madigan et al., 2018 ; Prescott et al., 2020)

Test	Substrat	Enzyme	Produit(s)	Effet sur le pH	Résultat positif	Résultat négatif	Particularités
------	----------	--------	------------	-----------------	------------------	------------------	----------------

Test	Substrat	Enzyme	Produit(s)	Effet sur le pH	Résultat positif	Résultat négatif	Particularités
LDC (Lysine décarboxylase)	Lysine	Lysine décarboxylase	Cadavérine + CO ₂	Alcalinisation	Milieu violet (pH ↑)	Milieu jaune (pH ↓)	Anaérobie-induite ; nécessite couche de paraffine
ODC (Ornithine décarboxylase)	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Putrescine + CO ₂	Alcalinisation	Milieu violet	Milieu jaune	Fermentation initiale du glucose nécessaire à l'induction
ADH (Arginine dihydrolase)	Arginine	Système ADH (multienzymatique)	Ornithine + NH ₃ + CO ₂	Alcalinisation	Milieu violet	Milieu jaune	Implique une hydrolyse en 2 étapes ; anaérobie nécessaire

4.4.4 Culture en batch (fermentation) pour production de GABA :

La fermentation est un processus métabolique anaérobie, au cours duquel des micro-organismes (principalement des bactéries, levures ou moisissures) transforment des substrats organiques complexes (généralement des glucides, mais aussi des protéines ou des lipides) en produits plus simples, tels que des acides organiques (acide lactique, acétique...), des alcools (éthanol, butanol), des gaz (CO₂, H₂) ou des acides aminés.

La culture en batch est l'une des stratégies les plus utilisées pour la production fermentaire de GABA, notamment avec des bactéries lactiques telles que *Lactobacillus brevis* ou *Lactobacillus plantarum*. Elle permet de transformer efficacement une source de L-glutamate en acide γ -aminobutyrique (GABA) via l'activité enzymatique de la glutamate décarboxylase (GAD).

4.4.4.1 Préparation de l'inoculum :

Dans le cadre de production de GABA, une étape de pré-culture a été effectuée. Elle consiste àensemencer un milieu de culture bouillon M17 à l'aide de colonies bactériennes isolées, prélevées de manière aseptique à l'aide d'une anse de platine stérile. L'inoculation est suivie d'une incubation à 30 °C pendant 18 heures, favorisant la croissance des cellules en phase exponentielle.

Les cultures obtenues ont été homogénéisées, puis leur densité optique (DO) a été mesurée à une longueur d'onde de 600 nm (DO600). Chaque suspension a été ajustée à un standard de 0,5 McFarland, ce qui correspond à une concentration estimée d'environ $1,5 \times 10^8$ UFC/ml et une absorbance comprise entre 0,08 et 0,10 à 600 nm, selon les recommandations de la norme CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015).

4.4.4.2 Préparation du milieu de culture :

Le milieu de culture a été formulé en ajoutant 2,5 g de glutamate monosodique (MSG, *monosodium glutamate*) dans un litre de bouillon M17. Le MSG agit comme source principale de L-glutamate, qui constitue le substrat direct de l'enzyme glutamate décarboxylase (GAD) produite par certaines bactéries lactiques.

Cette enzyme catalyse la transformation du L-glutamate en acide γ -aminobutyrique (GABA), un métabolite bioactif d'intérêt. L'utilisation du MSG comme inducteur et substrat carboné spécifique pour la biosynthèse du GABA a été largement documentée, notamment chez les espèces *Lactobacillus brevis* et *Lactococcus lactis* (Komatsuzaki et al., 2005 ; Dhakal et al., 2012).

4.4.4.3 Mise en culture pour la production de GABA :

Le choix d'un milieu de fermentation approprié constitue une étape déterminante pour optimiser la biosynthèse de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) par les bactéries lactiques.

Dans ce cadre, 10 ml d'un inoculum préalablement préparé ont été transférés de manière aseptique dans 90 ml de milieu M17 liquide, répartis dans des erlenmeyers stériles de 250 ml. Les flacons ont été soigneusement obturés à l'aide de bouchons de coton recouverts de papier aluminium stérilisé, afin de prévenir toute contamination externe et de maintenir des conditions d'anaérobiose stricte.

Les cultures ont ensuite été incubées à température ambiante (environ 25–28 °C) pendant une durée de 7 jours, sous agitation constante à 180 tours par minute (rpm), afin de favoriser



Figure 15: Incubation des milieux à T° et pH optimaux en anaérobiose , une durée de 7 jours

l'homogénéisation du milieu de fermentation (Azzimi Sohedein et al 2020).

4.4.4.4 Traitement post-fermentaire pour l'obtention de l'extrait surnageant :

À l'issue des 7 jours de fermentation, le bouillon fermenté a été soumis à une étape de filtration à travers des filtres en papier, en vue de séparer les cellules bactériennes du surnageant. Le filtrat obtenu a ensuite été centrifugé à 4500 tours par minute (rpm) pendant 20 minutes à température ambiante, afin d'éliminer les particules résiduelles et les débris cellulaires. Le surnageant clarifié a été soigneusement récupéré, tandis que le culot bactérien a été éliminé. Ce surnageant constitue la fraction contenant les métabolites extracellulaires, notamment le GABA, destiné à être quantifié ou analysé ultérieurement.



Figure 16: Filtration des milieux fermentés



Figure 18 : Centrifugation de filtrat à 4500 tours par minute (rpm) pendant 20 minutes



Figure 19: 1ml ninhydrine 3 % ajouter au 9 ml surnageants mères



Figure 20: Incubation des mélanges dans un bain-marie à une T° entre 90 et 100°C



Figure 17: Virage de couleur à la violette

4.4.4.5 Dosage colorimétrique du GABA par la méthode à la ninhydrine :

Après fermentation, 0,5 ml du surnageant a été prélevé et mélangé avec 0,5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 % pour précipiter les protéines. Le mélange a été centrifugé à 10 000 tours par minute pendant 10 minutes.

Les surnageants clairs obtenus a ensuite été dilués : 0,5 ml de cette solution a été transféré dans une fiole jaugée, puis complété avec de l'eau distillée stérile jusqu'à un volume final de 20 ml, correspondant à une dilution au 1/40^e (v/v).



Figure 21: Centrifugation de mélange à 10 000 tours par minute pendant 10 minutes

Le dosage des acides aminés libres, notamment le GABA, a été réalisé selon une méthode colorimétrique utilisant la ninhydrine. Pour ce faire, 9 ml de chaque solution diluée au 1/40^e ont été prélevés, puis mélangés avec 1 ml de réactif de ninhydrine à 3 %.

Les mélanges ont été incubés dans un bain-marie à une température comprise entre 90 et 100 °C pendant 10 minutes. La ninhydrine réagit spécifiquement avec les groupements amines des acides aminés libres, formant un complexe chromogène de couleur violette. L'intensité de cette coloration, proportionnelle à la concentration en GABA présent dans l'échantillon, a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 590 nm (Siragusa, S., et al 2007 ; Dhakal, R., et al, 2012).



Figure 23: Surnageants dilués au 1/40^e (v/v)



Figure 24 : 1ml ninhydrine à 3 % ajouter au 9ml de surnageants dilués au 1/40^e (v/v)



Figure 22: Incubation des mélanges dans un bain-marie à une T° entre 90-100 °C

4.4.4.6 Préparation de la solution étalon pour la courbe d'étalonnage :

Pour l'établissement de la courbe d'étalonnage du GABA, une solution standard a été préparée en mélangeant 0,5 ml de glutamate monosodique (MSG 0,25%) avec 0,5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 10 %. Cette solution a ensuite servi de base pour la réalisation de dilutions successives, utilisées comme solutions étalons afin de générer la courbe de calibration spectrophotométrique.

Une série de dilutions successives a été réalisée à partir de la solution mère afin d'établir la courbe d'étalonnage du GABA.

Chaque dilution a été préparée en transférant 0,5 ml de la solution mère dans une fiole jaugée, puis en complétant jusqu'au volume final souhaité à l'aide d'eau distillée stérile.

Les solutions obtenues ont ensuite été analysées par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 590 nm (Siragusa, S., et al 2007 ; Dhakal, R., et al, 2012).



Figure 25: : Solution standard

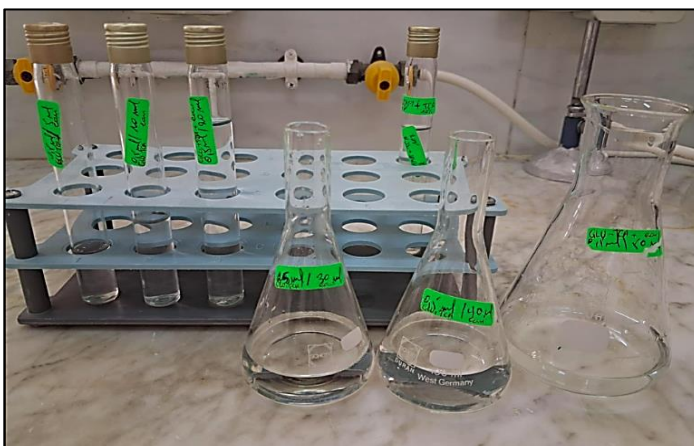


Figure 27: Série de dilutions de la solution standard de $1/10^e$ au $1/100^e$



Figure 26: étalonnage de spectrophotométrie

Le tableau ci-dessous récapitule les différentes dilutions effectuées.

Tableau 12: Dilutions successives préparées à partir de la solution standard

Volume de solution mère prélevé (ml)	Volume d'eau ajoutée (ml)	Volume final après dilution (ml)	Facteur de dilution (v/v)	Formulation académique
0,5	4,5	5	1/10	Dilution au $1/10^e$
0,5	9,5	10	1/20	Dilution au $1/20^e$
0,5	19,5	20	1/40	Dilution au $1/40^e$
0,5	29,5	30	1/60	Dilution au $1/60^e$
0,5	39,5	40	1/80	Dilution au $1/80^e$
0,5	49,5	50	1/100	Dilution au $1/100^e$

Chapitre V

Résultats et discussion

1 Résultat d'analyse microbiologique :

1.1 L'ensemencement et la purification :

L'ensemencement des solutions mères ainsi que de leurs dilutions successives a permis d'isoler une diversité de microorganismes, incluant des bactéries, des levures et des moisissures. Ces microorganismes ont présenté une croissance satisfaisante sur le milieu gélosé MRS, aussi bien en conditions aérobies qu'anaérobies, après une incubation de 72 heures à 30 °C et à 44 °C.

Résultats des cultures incubées à 30°C en aérobie et anaérobie :



Figure 29: Cultures isolées de SM1 et ses dilutions dans une température de 30°C en aérobie.

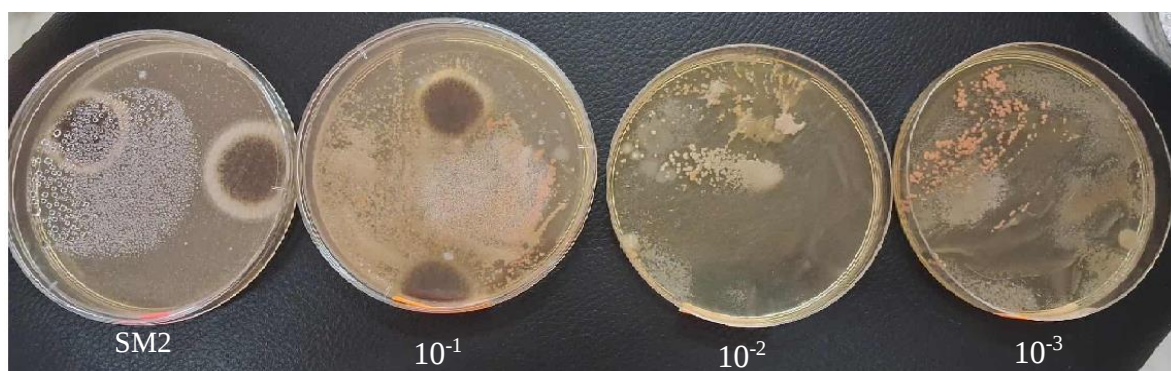


Figure 28: Cultures isolées de SM2 et ses dilutions dans une température de 30°C en aérobie.

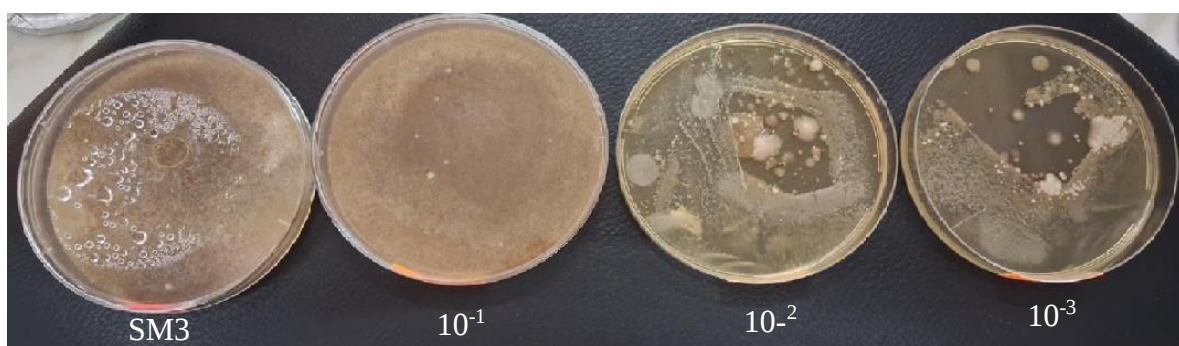


Figure 30: Cultures isolées de SM2 et ses dilutions dans une température de 30°C en aérobie.

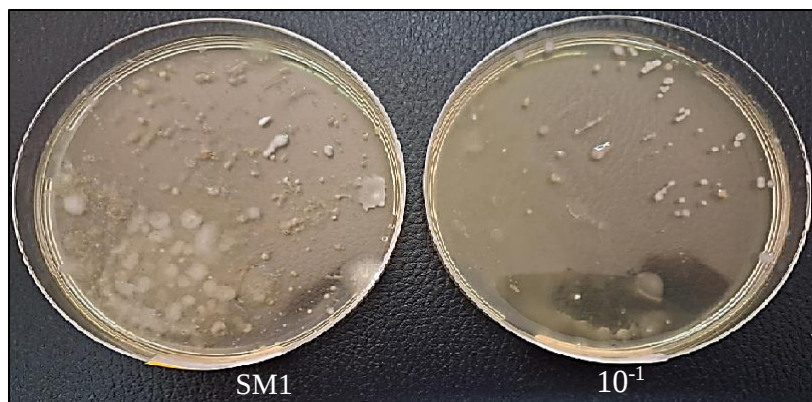


Figure 32: Cultures isolées de SM1 et dilution 10-1 a une température de 30°C en anaérobie.

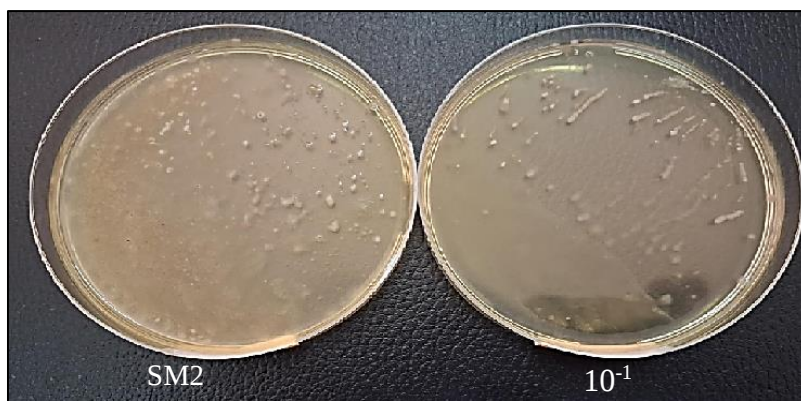


Figure 31: Cultures isolées de SM2 et dilution 10-1 a une température de 30°C en anaérobie.

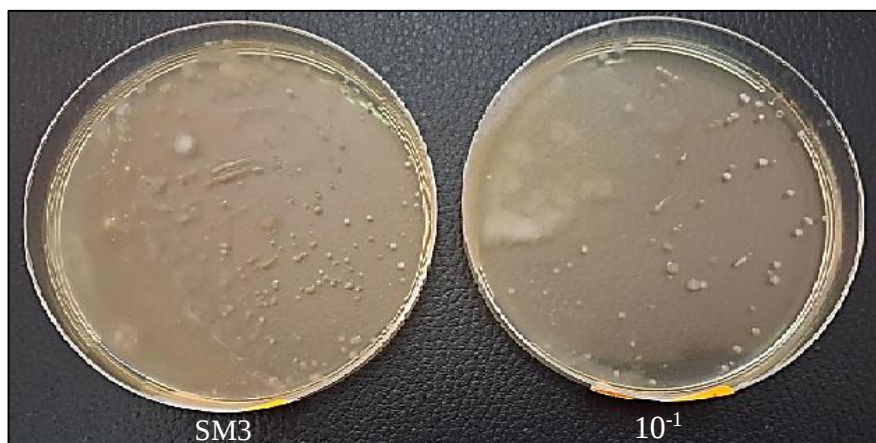


Figure 33: Cultures isolées de SM 3 et dilution 10-1 a une température de 30°C en anaérobie.

Résultats des cultures incubées à 44°C en aérobie et anaérobie :

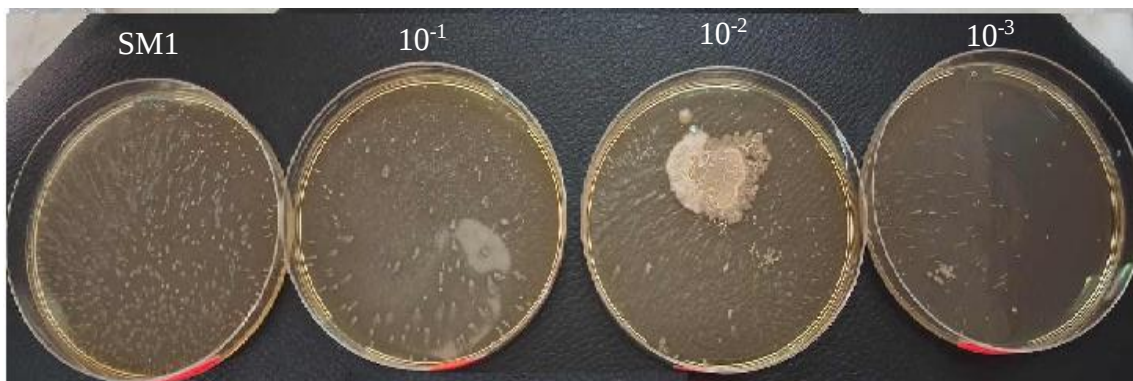


Figure 34: Cultures isolées de SM1 et ses dilutions dans une température de 44°C en aérobie.

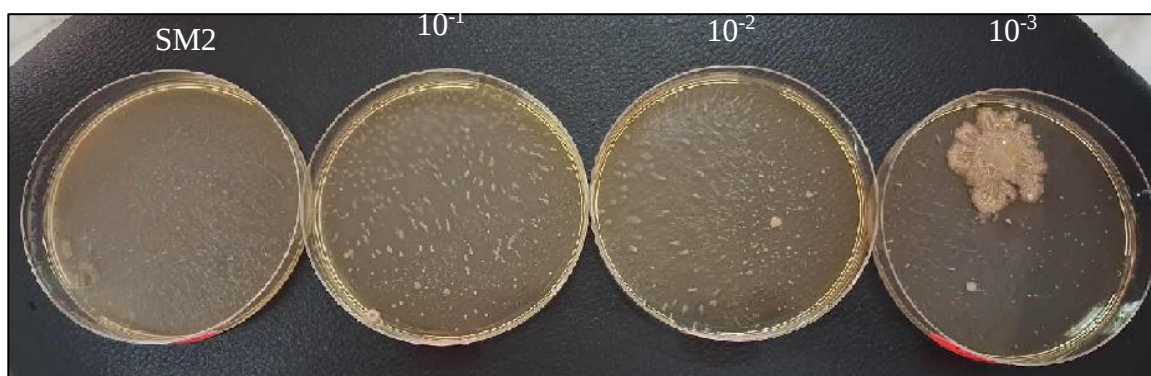


Figure 36: Cultures isolées de SM2 et ses dilutions dans une température de 44°C en aérobie.

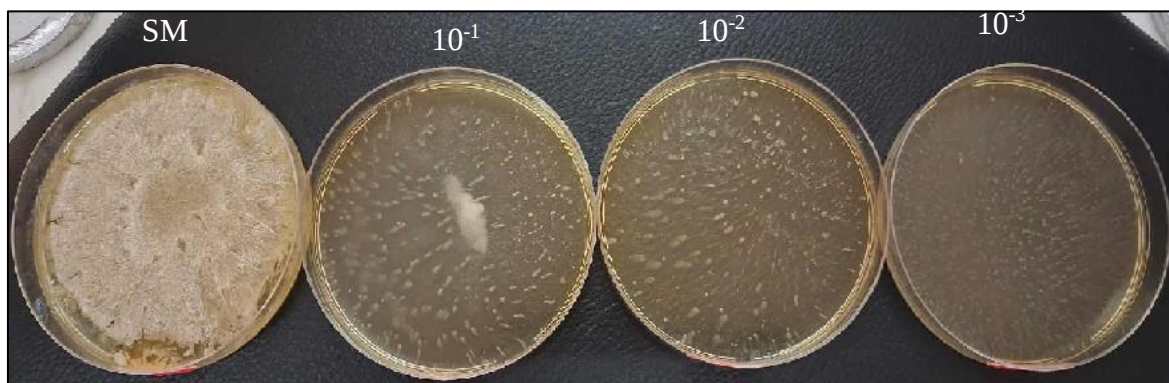


Figure 35: Cultures isolées de SM3 et ses dilutions dans une température de 44°C en aérobie.

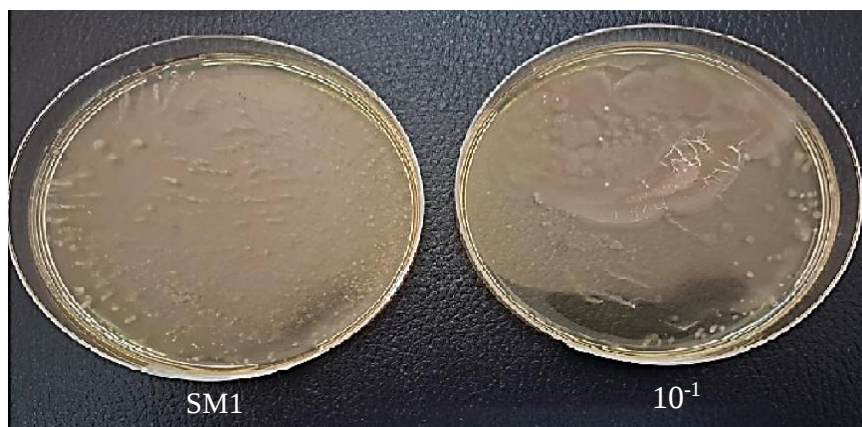


Figure 38: Cultures isolées de SM1 et dilution 10-1 a une température de 44°C en anaérobie.

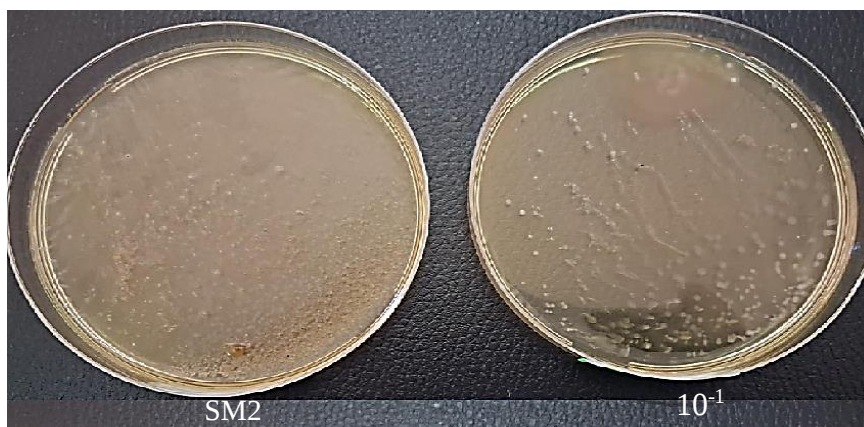


Figure 37: Cultures isolées de SM2 et dilution 10-1 a une température de 44°C en anaérobie.

Parmi les isolats obtenus, seules sept souches ont été retenues pour une purification successive par repiquages, en vue de leur identification et de l'évaluation de leur capacité à

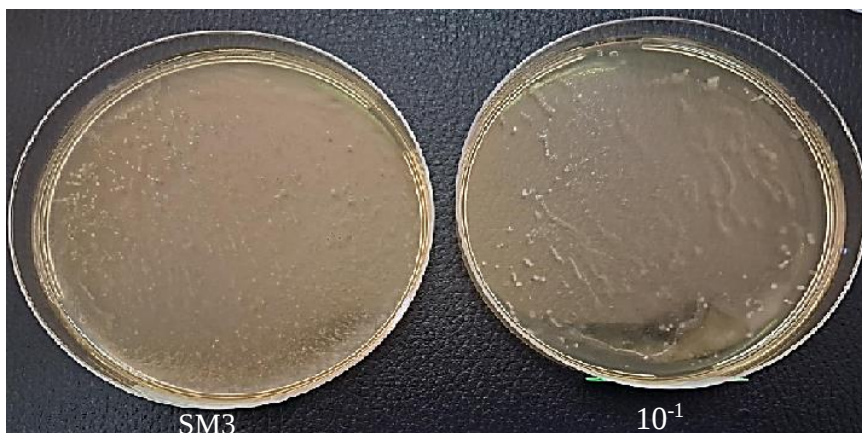


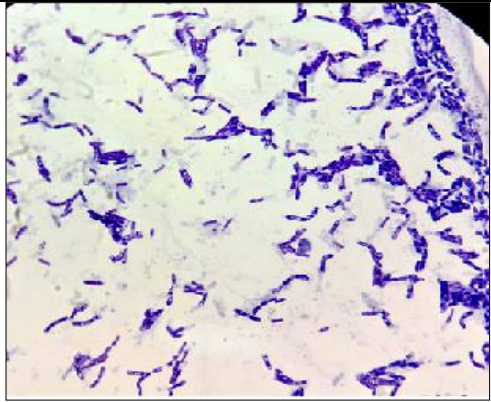
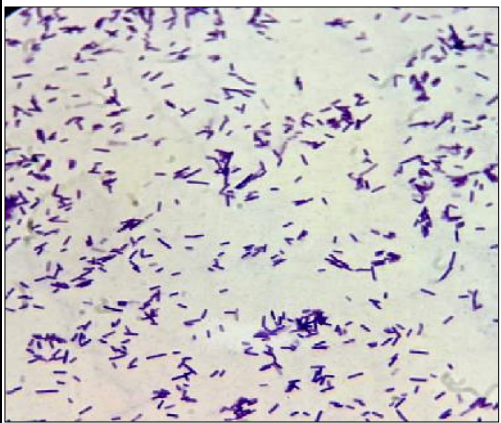
Figure 39: Cultures isolées de SM3 et dilution 10-1 a une température de 44°C en anaérobie.

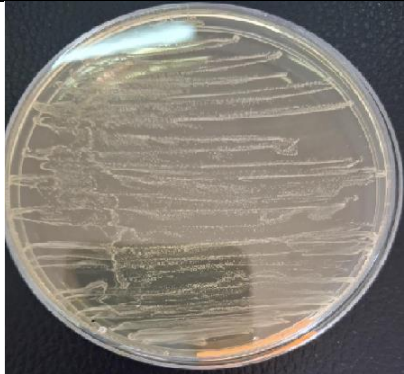
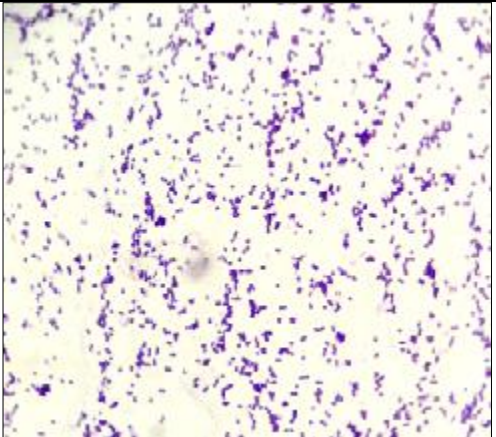
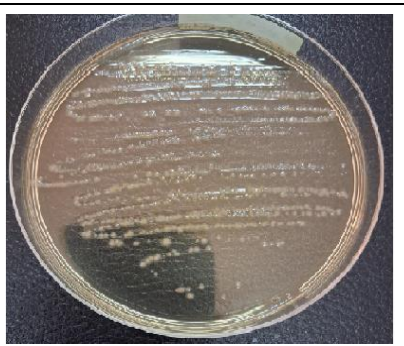
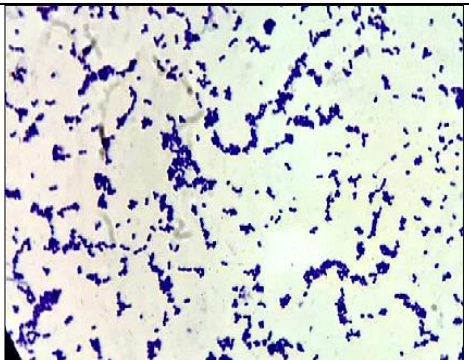
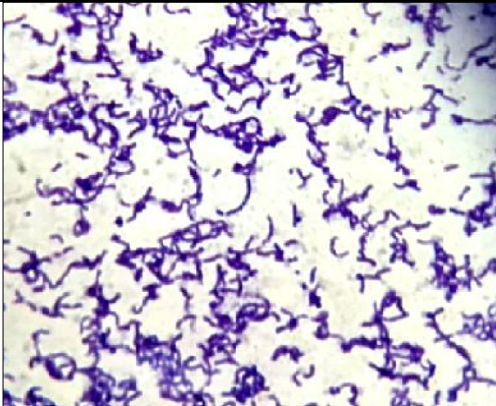
produire de l'acide γ -aminobutyrique (GABA).

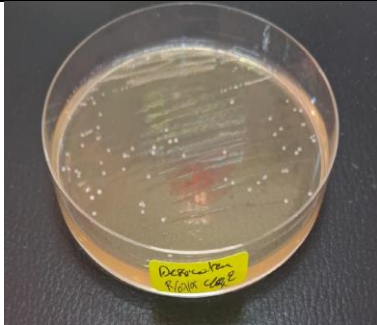
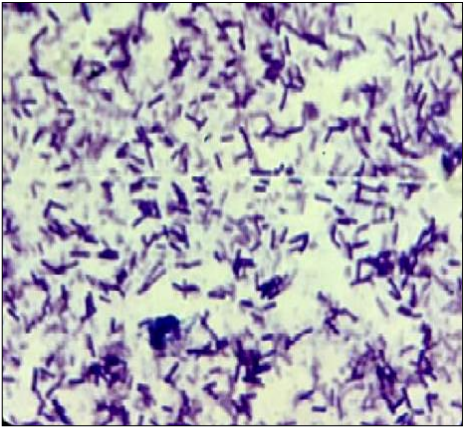
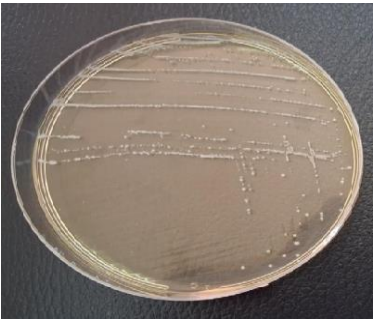
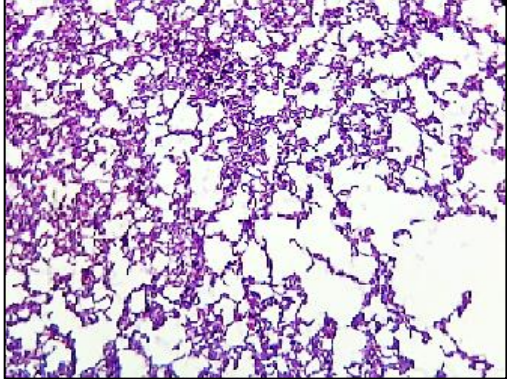
1.2 Identification des bactéries :

Les résultats des observations morphologiques, tant macroscopiques que microscopiques, sont récapitulés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 13: Résultat d'observations macroscopiques et microscopiques

Echantillons	Observations macroscopiques	Observations microscopiques
BFH1	 Taille : Moyenne à grande. couleur : blanchâtre surface : lisse contour : régulier brillance : brillante	 Gram+ Observations : bacilles, isolés ou en palissades ; cellules sporulées
BFH2	 Taille : Moyenne Couleur : brune Surface : lisse Conteur : régulier Brillance : brillante	 Gram+ Observations : petits cocci en chainettes courtes .

BFH3		Taille : très petite. Couleur : transparente à blanche. Surface : régulière. Brillance : brillante.	 Gram+ Observations : petits cocci dispersés ou en paires
BFH4		Taille : Moyenne Couleur : crème claire Surface : lisse. Brillance : rillante. Conteur : irrégulier	 Gram+ Observations : petits cocci en chainettes courtes.
BFH5		Taille : Moyenne a petit. Couleur : blanche. Surface : lisse, Conteur : régulier. Brillance : peu brillante.	 Gram+ Observations : Cocci en chainettes longues

BFH6		Taille : moyenne Couleur : blanche Surface : lisse. Conteur : régulier. Brillance : peu brillante.	 Gram+ Observations : cocci en chainettes courtes.
BFH7		Taille : Moyenne a petit. Couleur : blanche. Surface : lisse, Conteur : régulier. Brillance : peu brillante.	 Gram+ Observations : Cocci en chaînettes de longueurs variables.

Ces bactéries purifiées par repiquage sont criblées et identifiées biochimiquement par des tests classiques

1.3 Résultats d'identification biochimique classique des bactéries sélectionnées :

Tableau 14: Résultat d'identification biochimique classique des bactéries sélectionnées

	Tes catalase	Tes oxydase	Autres testes biochimiques
BFH1	 C. blanches Catalase	 C. blanches Oxydase	
BFH2	 Catalase C. brunes	 C. brunes Oxydase	
BFH3	 Petites colonies catalase	 Petites colonies oxydase	

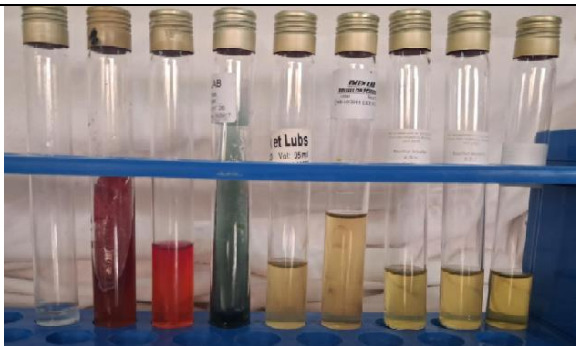
BFH4			
BFH5			
BFH6			



Tableau 15: Interprétation des résultats d'identification biochimique classique des bactéries sélectionnées

	BFH1	BFH2	BFH3	BFH4	BFH5	BFH6	BFH7
LDC	-	+	-	+	-	-	-
ODC	-	+	-	+	-	-	-
ADH	-	+	+	+	+	-	+
Shubert	-	+	+	+	+	-	-
Clarch et Lubs	-	-	-	-	-	-	+
Citrate de Simmons	-	-	-	-	-	-	+
Mannitol	+	-	-	-	+	+	-
Mobilité	mobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile	Immobile
TSI							
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	+	+	+	-	+
Saccharose	-	-	+	+	+	-	+
Glucose	+	-	+	-	+	-	+
CO ₂	-	-	-	+	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	+	-
Catalase	+	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-
	Aero-anaérobie	Aero-anaérobie	Aero-anaérobie	Aero-anaérobie	Aero-anaérobie	Aero-anaérobie	Aero-anaérobie
T° de culture	30°C	30°C	30°C et 44°C	30°C	30°C	30°C	30°C et 44°C
Orientation	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>

1.4 Analyse microbiologique des bactéries sélectionnées du blé fermenté (BFH1 à BFH7) :

L'étude microbiologique des cellules bactériennes isolées à partir de blé fermenté repose sur une évaluation complète de leurs caractéristiques macroscopiques, microscopiques, biochimiques et physiologiques, en s'appuyant sur des références systématiques telles que le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Whitman et al., 2012), Axelsson (2004).

➤ **BFH1 – *Bacillus* spp**

- **Macroscopie** : Colonies blanches, de forme régulière.
- **Microscopie** : Bacille Gram positif de grande taille (3 à 5 µm de long), spores centrales ou subterminales visibles.
- **Physiologie** : Aérobie facultatif, croissance optimale à 30°C, mobile.
- **Biochimie** : Catalase (+), Mannitol et Glucose fermentés (+), test décarboxylases négatif.
- **Interprétation** : Profil compatible avec *Bacillus cereus*, espèce sporulée, mobile, fréquemment isolée des substrats céréaliers.

➤ **BFH2 – *Lactococcus* spp**

- **Macroscopie** : Colonies brunes circulaires, de bord lisse.
- **Microscopie** : Petits cocci Gram + en chaînettes courtes, immobiles, diamètre de 0,7 à 1,2 µm.
- **Physiologie** : Aéro-anaérobie, croissance à 30°C.
- **Biochimie** : Catalase (-), LDC/ODC/ADH/Shubert (+), Glucose non fermenté (-).
- **Interprétation** : Caractéristiques typiques de *Lactococcus lactis*, prédominant dans les fermentations lactiques du blé.

➤ **BFH3 – *Pediococcus* spp.**

- **Macroscopie** : Petites colonies circulaires, opaques.
- **Microscopie** : Cocci Gram +, en paires ou cellules dispersées, immobiles, taille de 0,5 à 1 µm.

- **Physiologie** : Aéro-anaérobie, croissance entre 30 et 44°C.
- **Biochimie** : ADH/Shubert (+), Lactose/Saccharose/Glucose (+), catalase (-).
- **Interprétation** : Comportement homofermentaire cohérent avec les *Pediococcus*, largement rapportés dans les produits fermentés céréaliers.
- **BFH4 – Leuconostoc spp.**
- **Macroscopie** : Colonies visqueuses, convexes, bord régulier.
- **Microscopie** : Cocci Gram + en chaînes courtes, immobiles, diamètre de 0,6 à 1 µm.
- **Physiologie** : Hétérofermentaire, production de CO₂, croissance à 30°C.
- **Biochimie** : LDC/ODC/ADH/Shubert (+), CO₂ (+), sucres fermentés, catalase (-).
- **Interprétation** : Ce profil correspond à *Leuconostoc mesenteroides*, souvent identifié dans les fermentations traditionnelles du blé (Ben Mehel, Axelsson).
- **BFH5 – Streptococcus spp (groupe mésophile)**
- **Macroscopie** : Colonies petites, blanches, brillantes.
- **Microscopie** : Cocci Gram + en longues chaînes, immobiles, diamètre de 0,7 à 1 µm.
- **Physiologie** : Croissance optimale à 30°C, aéro-anaérobie.
- **Biochimie** : ADH/Shubert (+), Glucose/Lactose (+), catalase (-).
- **Interprétation** : Caractéristiques compatibles avec le groupe des streptocoques lactiques mésophiles, tels que *S. salivarius*.
- **BFH6 – Enterococcus spp.**
- **Macroscopie** : Colonies convexes, opaques.
- **Microscopie** : Cocci Gram + en paires ou petites chaînes, immobiles, diamètre de 0,6 à 1 µm.
- **Physiologie** : Aéro-anaérobie, croissance à 30°C.
- **Biochimie** : Mannitol/ONPG (+), catalase (-), tests décarboxylases négatifs.
- **Interprétation** : Profil représentatif des *Enterococcus*, isolés de matrices végétales fermentées.

- **BFH7** – *Streptococcus* spp (groupe thermophile)
 - **Macroscopie** : Colonies lisses, convexes, mucosiques.
 - **Microscopie** : Cocci Gram + en chaînes, immobiles, diamètre de 0,7 à 1,2 μm .
 - **Physiologie** : Thermophile (croissance à 44°C), aéro-anaérobie.
 - **Biochimie** : Citrate (+), Clarch et Lubs (+), Glucose/Lactose/Saccharose (+), catalase (-).
 - **Interprétation** : Profil représentatif de *Streptococcus thermophilus*, généralement présent dans des environnements thermophiles, parfois détecté dans des fermentations céréalières.

1.5 Discussion :

L'analyse croisée des résultats met en évidence une forte représentativité des bactéries lactiques Gram+ dans l'écosystème fermentaire du blé.

Dans notre étude, la composition microbienne est majoritairement dominée par des cocci lactiques, ce qui concorde avec plusieurs travaux antérieurs. En effet, cette prédominance a été largement rapportée dans la littérature scientifique.

Les cocci lactiques tels que *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus* dominant, en cohérence avec les travaux de **Merabti, (2015)** ; **Mokhtari.S,(2016)**, **Boubakeur et al. (2016 ; 2018)**, **Ben Mehel et al (2018)**, **Yahiaoui Z et al (2018)**, **OUHAB et al (2018)** et les données du **Soungalo et al (2019)**.

D'après les études de Mokhtari.S, (2016), les bactéries lactiques isolées à partir du blé fermenté de type *Hamoum* (souches BFH) sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Souches	Fréquence (%)	Genre	Espèce identifiée
BFH1, BFH3	37,5 %	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
BFH2	12,5 %	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>
BFH4	12,5 %	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>destranicum</i>
BFH5	12,5 %	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
BFH7	12,5 %	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i> sp.
BFH6, BFH8	25 %	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>

Selon les travaux de Ben Mehel, B et al, 2018:

L'identification physiologique et biochimique de la flore bactérienne endogène du BFH a révélée **41** souches Gram positif et catalase négative ayant une activité amylolytique et protéolytique performante.

Les bactéries les plus représentées appartiennent aux genres ***Lactobacillus***: (*L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. brevis*, *L. paracasei ssp paracasei 3* et *L. paracasei ssp paracasei 1*) avec un taux de 52 %.

Pédiococcus (*P. pentosaceus1* et *P. acidilactici*) avec un taux de 14 %,

Streptococcus (*S. thermophilus* et *S. bovis*) avec un taux de 12 %.

Lactococcus (*Lac. raffinolactis* et *Lac. ssp lactis 1*) avec un taux de 10 %,

Leuconostoc *mesenteroïde* avec un taux de 10 %

Entéroccoccus (*Weissella confusa*) avec un taux de 02 %.

D'après les études de **Yahiaoui Z et al, 2018** et **Soungalo et al, (2019)** ; les bactéries lactiques isolées sont confirmées par MALDI-TOF test :

Weissella spp

Lactococcus lactis

Enterococcus durans ; *S. faecalis var durans*

Enterococcus faecalis

Pediococcus acidilactici.

L'ensemble des souches présente des profils microbiens cohérents avec la flore attendue du blé fermenté. La dominance de cocci Gram+ immobiles, catalase négative, révèle une flore lactique typique, enrichie par quelques bactéries sporulées ou thermophiles.

Ces résultats renforcent les données publiées sur les microbiotes des céréales fermentées traditionnelles nord-africaines (Mokhtari,S, 2016 ; Ben Mehel, B et al, 2018 ; Soungalo et al, 2019).

1.6 Conservation des souches :

La conservation des souches pures a été faite selon deux méthodes : à court et à long terme.

- A court terme (**Figure**), elle a été repiquée sur la gélose MRS inclinée en tube et conservée à 4°C. Le repiquage est répété chaque mois.

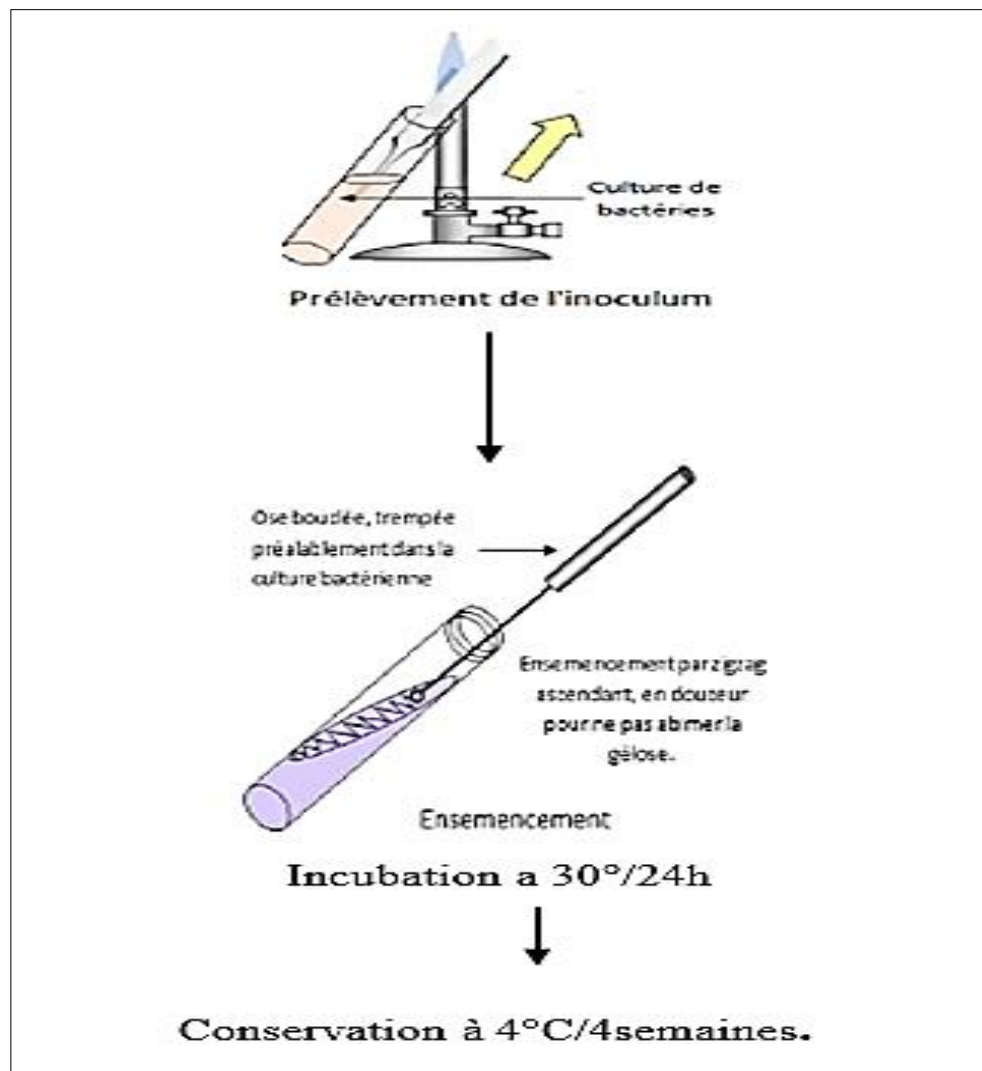


Figure 40: Schéma de conservation courte durée des bactéries lactiques purifiées

- A long terme (Figure), les souches sont conservées dans une solution contenant 70% de lait écrémé (enrichie par 0.5g/l d'extrait de levure et 0.5g/l de gélose) et 30% de glycérol à 40°C à -20°C .

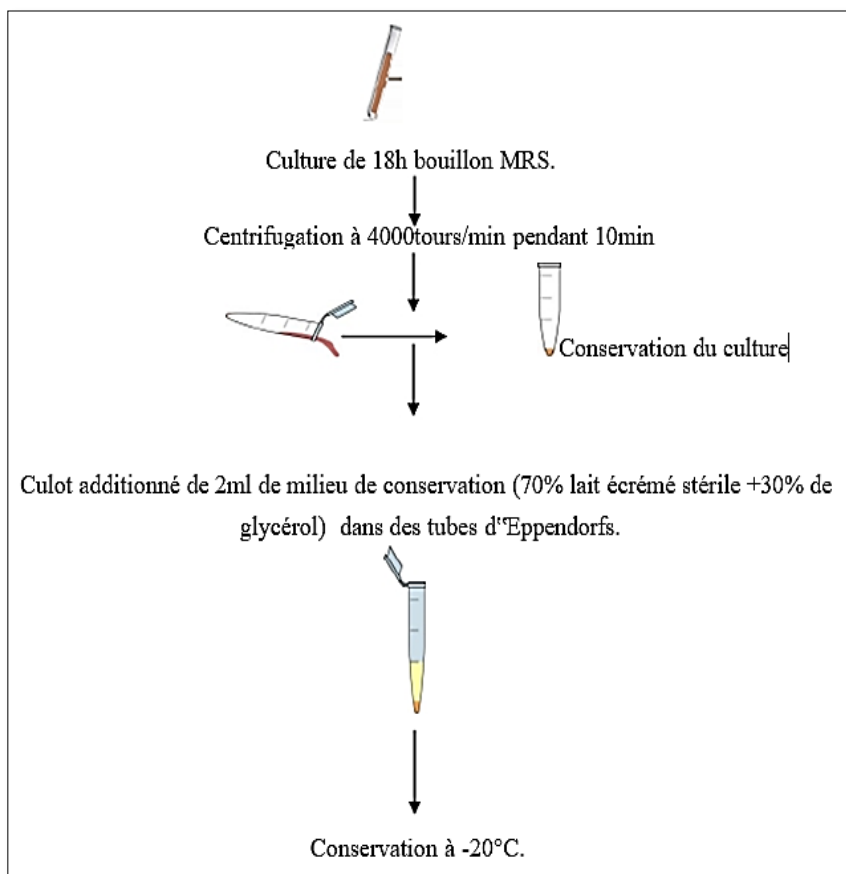


Figure 41:Schéma de conservation longue durée des bactéries lactiques purifiées

1.7 La production de GABA :

1.7.1 Résultats de la densité optique des suspensions bactériennes :

Tableau 16: Résultats de standardisation.

La souche bactérienne	La densité optique (DO _{600 nm})
BFH1	0.104
BFH2	0.095
BFH3	0.109
BFH4	0.092
BFH5	0.108
BFH6	0.102

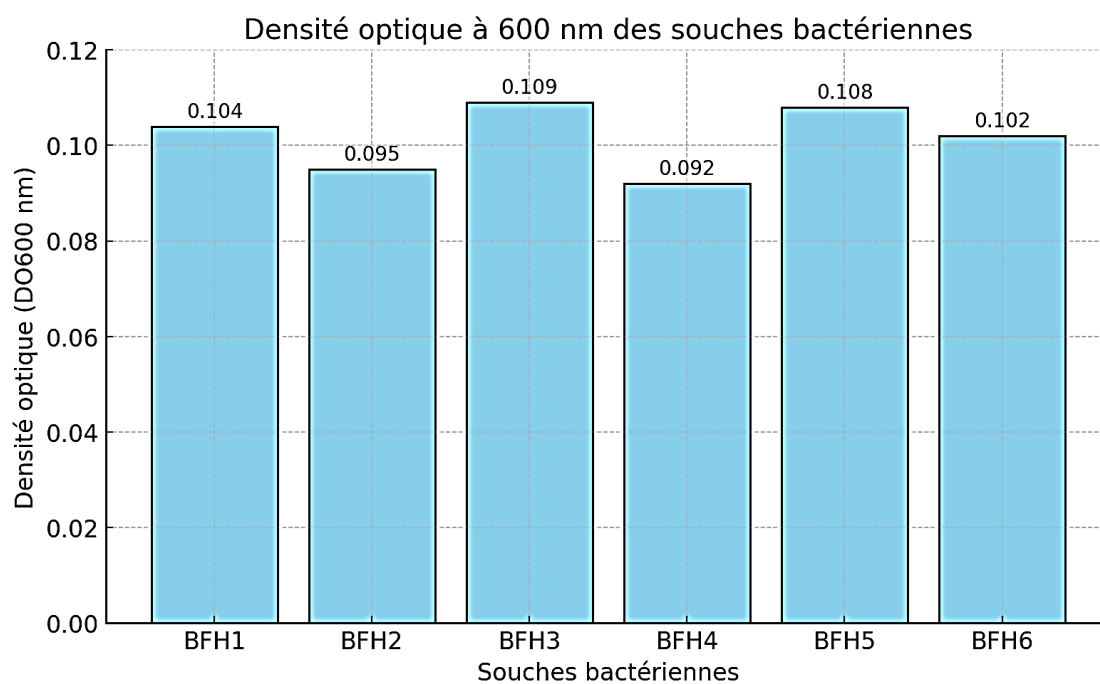


Figure 42: : histogramme représentant la densité optique (DO_{600 nm}) pour chaque souche bactérienne.

1.7.2 Résultat de dosage colorimétrique du GABA par la méthode à la ninhydrine dans les solutions fermentées :

Tableau 17: Absorbances à 590 nm des échantillons fermentés dilués (1/40^e) pour le dosage indirect

Echantillons	dilutions	Absorbances à 590 nm
BFH1	1/40 ^e (v/v)	0,109
BFH2	1/40 ^e (v/v)	0,095
BFH3	1/40 ^e (v/v)	0,035
BFH4	1/40 ^e (v/v)	0,036
BFH5	1/40 ^e (v/v)	0,030
BFH6	1/40 ^e (v/v)	0,103



Figure 45: 1ml ninhydrine 3 % ajouter au 9 ml surnageants mères



Figure 43: Incubation des mélanges dans un bain-marie à une T° entre 90 et 100°C



Figure 44: Virage de couleur à la violette

Le virage de couleur vers le violet observé dans les solutions fermentées après addition de la ninhydrine constitue une preuve indirecte de la présence d'acides aminés libres. Ce changement de couleur résulte de la réaction spécifique de la ninhydrine avec le groupement α -

aminé des acides aminés, produisant un complexe pourpre, souvent appelé "violet de Ruhemann" (Friedman, 2004 ; Michel, 2020).

Cette méthode est largement utilisée pour la détection qualitative et quantitative des acides aminés dans des matrices biologiques ou alimentaires, notamment dans les milieux fermentés.

Bien que la littérature récente privilégie des approches métabolomiques et chromatographiques pour caractériser les profils en acides aminés notamment dans des fermentations traditionnelles

Par ailleurs, la métabolisation des acides aminés par les bactéries lactiques est bien documentée pour la formation de composés d'arôme et de nutriments bioactifs.

La littérature moderne se concentre plutôt sur l'analyse chromatographique, métabolomique et protéomique des acides aminés et peptides en milieu fermenté (Jiang L et al, 2024 ; Kurohara et al, 2025).

1.7.3 Résultat de dosages spectrophotométrique des solutions étalon pour la courbe d'étalonnage :

Tableau 18: Solutions étalons de MSG et leurs absorbances mesurées à 590 nm

Volume de solution mère prélevé (ml)	Volume d'eau ajoutée (ml)	Volume final après dilution (ml)	Facteur de dilution (v/v)	Formulation académique	Absorbances à 590 nm
0,5	4,5	5	1/10	Dilution au 1/10 ^e	0,169
0,5	9,5	10	1/20	Dilution au 1/20 ^e	0,029
0,5	19,5	20	1/40	Dilution au 1/40 ^e	0,154
0,5	29,5	30	1/60	Dilution au 1/60 ^e	0,043
0,5	39,5	40	1/80	Dilution au 1/80 ^e	0,010
0,5	49,5	50	1/100	Dilution au 1/100 ^e	0,059



Figure 46: abs =0,154 (valeur de référence)

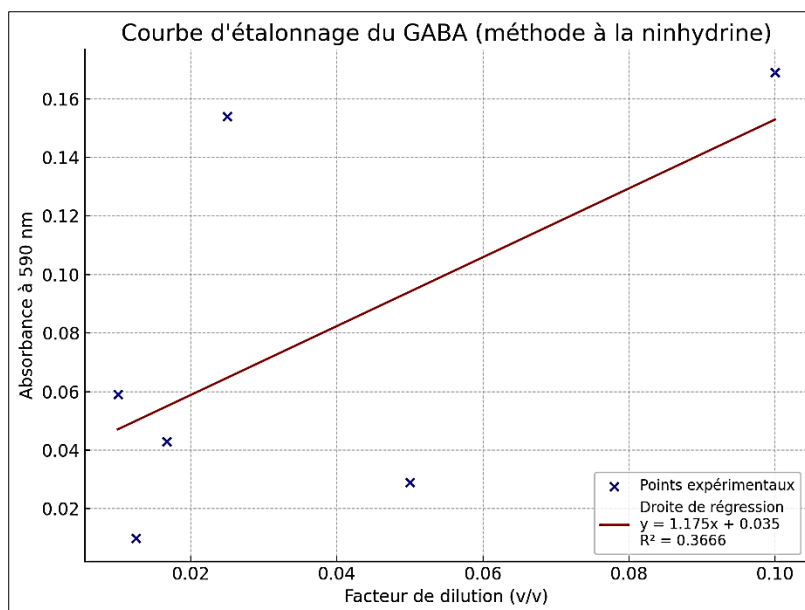
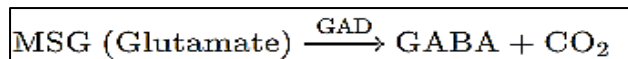


Figure 47: Courbe d'étalonnage obtenue par réaction du GABA avec la ninhydrine,

1.7.4 Estimation indirecte de la production de GABA à partir de la consommation du MSG, sur la base des mesures d'absorbance à 590 nm :

Dans le cadre de cette étude, le glutamate monosodique (MSG) a été utilisé à la fois comme substrat de fermentation pour la production de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et comme référence indirecte (étalon approximatif) pour estimer les teneurs en GABA des échantillons fermentés. En l'absence de solution étalon de GABA pure, une approche indirecte a été adoptée, basée sur la relation stœchiométrique de la réaction enzymatique catalysée par le glutamate décarboxylase (GAD) :



La solution initiale de MSG avait une concentration de 2,5 g/L, ce qui correspond, compte tenu de sa masse molaire (169,11 g/mol), à une concentration molaire de :

$$\frac{2,5 \text{ g}}{169,11 \text{ g/mol}} \approx 14,8 \text{ mmol/L}$$

Cela représente la quantité maximale de GABA pouvant être formée si 100 % du MSG est transformé.

D'autre façon, en supposant une conversion totale, la production maximale théorique de GABA serait de 14,8 mmol/L.

Une mesure d'absorbance à 590 nm a été réalisée sur un échantillon contenant uniquement du MSG non fermenté, dilué au 1/40^e et a donné une valeur de 0,154. Cette absorbance a été utilisée comme valeur de référence pour un taux de conversion nul (0 % de GABA produit).

Les échantillons fermentés, également dilués au 1/40^e, ont présenté des absorbances inférieures, reflétant ainsi une diminution de la teneur en MSG résiduel et par conséquent, une production de GABA proportionnelle.

Les pourcentages de MSG consommé et les concentrations estimées en GABA ont été

$$\text{Taux de conversion du MSG (\%)} = \frac{A_{\text{MSG}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{MSG}}} \times 100$$

$$[\text{GABA}] \text{ produite (mmol/L)} = \text{Taux de conversion} \times 14,8 \text{ mmol/L}$$

calculés selon la formule suivante :

ou :

- Calcul basé sur l'absorbance témoin à 590 nm : 0,154

$$\text{Pourcentage de MSG consommé} \approx \frac{0,154 - \text{Absorbance}}{0,154} \times 100$$

$$\text{GABA produit} = \text{Pourcentage de MSG consommé} \times 14,8 \text{ mmol/L}$$

- MSG initial estimé à 14,8 mmol/L
- Conversion 1 :1 MSG → GABA (approche simplifiée mais valable en absence d'un étalon GABA pur)

Les valeurs d'absorbance ont été utilisées pour estimer la consommation de MSG et la production de GABA par extrapolation stœchiométrique, selon la méthode décrite par Komatsuzaki et al. (2005) et validée dans d'autres travaux similaires (Li et al., 2010 ; Dhakal et al., 2012 ; Skoog et al., 2018).

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 19: Estimation de la production de GABA (mmol/L) à partir du taux de conversion du MSG (%) par les souches BFH1 à BFH6, sur la base des mesures d'absorbance à 590 nm

Échantillon	Taux de conversion du MSG (%)	GABA produit estimer (mmol/L)
BFH1	29,22 %	4,97
BFH2	38,31 %	6,51
BFH3	77,27 %	12,14
BFH4	76,62 %	12,03
BFH5	80,52 %	12,88
BFH6	33,12 %	5,63

Graphiques des résultats :

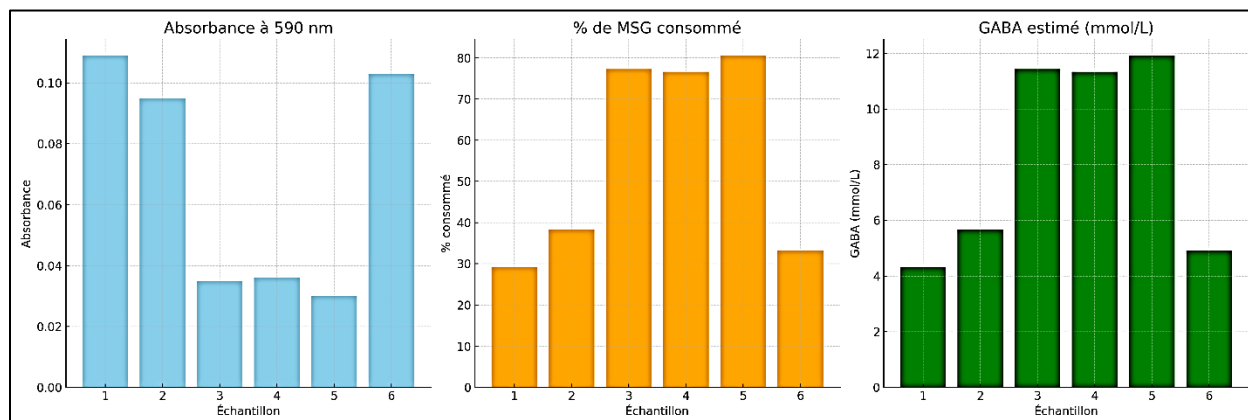


Figure 48: Visualisation comparative des absorbances, du pourcentage de MSG consommé et de la quantité estimée de GABA produite par fermentation.

1.7.5 Analyse quantitative et interprétation :

L'étude comparative des capacités de biosynthèse de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) par six souches bactériennes isolées du blé fermenté a révélé une importante variabilité interspécifique. Les résultats de production ont été estimés indirectement sur la base de la consommation du glutamate monosodique (MSG), mesurée par colorimétrie à la ninhydrine.

Les souches BFH3 (*Pediococcus* spp.), BFH4 (*Leuconostoc* spp.) et BFH5 (*Streptococcus salivarius*) ont présenté les taux de conversion les plus élevés, dépassant 75 %, avec des productions estimées entre 12,03 et 12,88 mmol/L de GABA. En particulier, la souche BFH5 a atteint un taux de conversion de 80,52 %, soit une production de 12,88 mmol/L, constituant la souche la plus performante du lot. Ces performances traduisent probablement une expression élevée du système glutamate décarboxylase (GAD), assurant une transformation efficace du MSG en GABA.

À l'opposé, les souches BFH1 (*Bacillus cereus*), BFH2 (*Lactococcus lactis*) et BFH6 (*Enterococcus* spp.) ont montré des taux de conversion modérés, compris entre 29,22 % et 38,31 %, correspondant à des productions de GABA inférieures à 7 mmol/L. Malgré cette production plus faible, la capacité de la souche BFH1 à synthétiser du GABA est en accord avec les résultats de Wan Mohtar et al. (2020), qui ont rapporté une production de 5,49 g/L (~53,4 mmol/L) par une souche de *Bacillus cereus* KBC isolée du moromi de sauce soja, sous conditions optimales (pH 6,5 ; 3 % NaCl ; 37 °C).

Ces données indiquent que les souches BFH3 à BFH5 représentent des candidates prometteuses pour une valorisation biotechnologique, notamment dans la formulation d'aliments fermentés fonctionnels enrichis en GABA, elles se situent dans les plages de production documentées pour d'autres bactéries lactiques reconnues, telles que :

- *Lactococcus lactis* : 0 à 24 mmol/L (jusqu'à 1,15 g/L dans des conditions optimisées) (Santos-Espinosa et al., 2020)
- *Leuconostoc mesenteroides* : jusqu'à 22,8 mmol/L (Ahn J et al., 2023)
- *Pediococcus pentosaceus*: généralement entre 10 et 70 mmol/L (Dhakal et al., 2012)
- *Enterococcus avium* G-15 : jusqu'à 115,7 g/L (~839 mmol/L) (Takayoshi et al., 2010)

En résumé, les performances des souches BFH3, BFH4 et BFH5, situées autour de 12 mmol/L, sont pleinement conformes aux profils de production attendus pour des bactéries lactiques productrices de GABA (Cui, Y et al., 2020), bien que restant inférieures aux niveaux atteints par certaines souches hyperproductrices comme *Enterococcus avium* G-15.

Ces résultats appuient la pertinence de la sélection des souches BFH en tant qu'agents microbiens d'intérêt pour des applications alimentaires ou nutraceutiques.

Une identification précise de ces souches (PCR, ARNr 16S, API) serait recommandée pour valoriser leur potentiel probiotique ou technologique.

Perspectives techniques :

Ces résultats ouvrent plusieurs axes d'amélioration :

1. Identification génétique des gènes *gadB* / *gadC* pour confirmer le potentiel enzymatique.
2. Quantification directe du GABA par HPLC pour valider les estimations colorimétriques.
3. Optimisation des conditions de culture (pH 4,5–5,5, température 30–37 °C, cofacteurs PLP) inspirée des stratégies utilisées pour *L. brevis* ou *E. avium*.
4. Sélection ou amélioration des souches les plus productives (BFH3–BFH5) pour la production d'aliments fermentés enrichis en GABA (nutraceutiques, probiotiques, hypotenseurs).

Conclusion Générale

Conclusion générale

Les résultats obtenus au cours de cette étude mettent en évidence la capacité différenciée de plusieurs souches bactériennes isolées de blé fermenté (BFH1 à BFH6) à convertir le glutamate monosodique (MSG) en acide γ -aminobutyrique (GABA), un métabolite bioactif d'intérêt fonctionnel et nutritionnel. L'approche expérimentale, basée sur la méthode colorimétrique à la ninhydrine et sur une estimation indirecte de la production de GABA par suivi de la consommation de MSG, a permis une évaluation quantitative fiable, malgré l'absence de standard de GABA pur.

L'analyse des profils d'absorbance à 590 nm a révélé une diminution significative des valeurs dans les milieux fermentés comparativement au témoin non fermenté, traduisant une consommation active du MSG. Les souches BFH3, BFH4 et BFH5 ont démontré les performances les plus remarquables, avec des taux de conversion du MSG supérieurs à 75 % et une production estimée de GABA atteignant jusqu'à 12,88 mmol/L. Cette activité biologique suggère la présence d'un système glutamate décarboxylase (GAD) fonctionnel et potentiellement régulé de manière efficace chez ces isolats.

La variabilité inter-souches observée dans la conversion du MSG en GABA souligne l'importance d'une sélection rigoureuse de souches à haute valeur ajoutée technologique, en particulier pour le développement de produits fermentés enrichis en GABA à visée nutraceutique. Ces résultats s'inscrivent en cohérence avec les données de la littérature, notamment celles rapportées pour certaines souches de *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ou *Enterococcus*, connues pour leur aptitude à la biosynthèse de GABA dans des environnements fermentaires.

Conclusion générale

En perspective, des analyses complémentaires, telles que l'identification génétique (gène *gadB*), la quantification chromatographique directe du GABA (HPLC), ainsi que l'étude des conditions optimales de fermentation (pH, température, cofacteurs), permettraient de consolider ces résultats et d'envisager l'exploitation industrielle des souches les plus prometteuses. Ces travaux constituent ainsi une base solide pour l'orientation vers des applications fonctionnelles en agroalimentaire, notamment dans la conception de produits fermentés à potentiel hypotenseur, neuroactif ou relaxant et neuroprotecteurs, riches en GABA.

Références

A – B

- Abdiouel, H., Martínez-Bueno, M., Valdivia Catalán, F. O., Fernández-Carballido, A., Rico, D., & Gálvez, M. del C.** (2020). *New insights in lactic acid bacteria fermentation: Applications and regulation*. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 124–138. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.034>
- Abdou, A. M., Higashiguchi, S., Horie, K., Kim, M., Hatta, H., & Yokogoshi, H.** (2006). Effets relaxants et immunostimulants de l'administration d'acide γ -aminobutyrique (GABA) chez l'homme. *BioFactors*, 26(3), 201–208. <https://doi.org/10.1002/biof.5>
- Ahn, J., & Park, J. Y.** (2023). Potential of γ -Aminobutyric Acid-Producing *Leuconostoc mesenteroides* Strains Isolated from Kimchi as a Starter for High- γ -Aminobutyric Acid Kimchi Fermentation. *Preventive Nutrition and Food Science*, 28(4), 492–501. <https://doi.org/10.3746/pnf.2023.28.4.492>
- Arena, M. P., Capozzi, V., Russo, P., Drider, D., Spano, G., & Fiocco, D.** (2021). Bioactive compounds produced by lactic acid bacteria: From health-promoting benefits to innovative applications in the food industry. *Foods*, 10(10), 2326. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8508027>
- Axelsson, L.** (2004). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (3^e éd., Chap. 1). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1>
- Axelsson, L.** (2015). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (4^e éd.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18610>
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., & Cocolin, L.** (2022). The evolving taxonomy of lactic acid bacteria and its impact on food and health. *Foods*, 11(5), 728. <https://doi.org/10.3390/foods11050728>
- Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J. L., Tyzio, R., & Khazipov, R.** (2007). GABA: A pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiological Reviews*, 87(4), 1215–1284. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2006>
- Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzsimons, N. A., McSweeney, P. L. H., Cotter, P. D., & Hill, C.** (2022). Bacterial morphology and identification methods in dairy lactic acid bacteria. In *Dairy Microbiology Handbook* (4^e éd.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch19>
- Boorstra, E., de Kleijn, R., Colzato, L. S., Alkemade, A., Forstmann, B. U., & Nieuwenhuis, S.** (2015). Neurotransmitters as food supplements: The effects of GABA on brain and behavior. *Frontiers in Psychology*, 6, 1520. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01520>

Borrero, J., Chen, Y., Dunny, G. M., & Kaznessis, Y. N. (2018). Bacteriocin production and applications in food safety. *Microbiology Spectrum*, 6(6), ARBA-0020-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0020-2017>

C – G

Chen, Y., Zhang, J., Liu, D., Zhang, C., Niu, H., Xin, X., Chen, J., Yi, H., & Liu, D. (2023). The impact of *Levilactobacillus brevis* YSJ3 and *Lactiplantibacillus plantarum* JLSC2-6 co-culture on GABA biosynthesis and gut microbiota modulation in vitro. *Food Chemistry*, 432, 137169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137169>

Cui, Y., Miao, K., Niyaphorn, S., & Qu, X. (2020). Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 995. <https://doi.org/10.3390/ijms21030995>

De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3 – The Firmicutes*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-6>

Dellarras, C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. Éditions Tec & Doc – Lavoisier.

Dhakal, R., Bajpai, V. K., & Baek, K. H. (2012). Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1230–1241. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400001>

Drabo, M., Khadem, H., Benotmen, N., Abdelhak, O., Mazouzi, F., Soualmi, K., & Boubakeur, B. (2019). Qualité microbiologique du blé dur fermenté de Matmor Hamoum : indispositions digestives, microflore avantageusement technologique et potentiels pathogènes. *International Journal of Innovation and Applied Studies*.

Friedman, M. (2004). Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 385–406.

Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>

H – M

Jiang, L., Chen, Y., Zhao, T., Li, P., Liao, L., & Liu, Y. (2024). Analysis of differential metabolites in *Liuyang douchi* at different fermentation stages based on untargeted metabolomics approach. *Food Chemistry: X*, 25, 102097. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.102097>

Kiousi, D. E., Chorianopoulos, N. G., & Soukoulis, C. (2019). Evaluation of folate production by lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. *LWT - Food Science and Technology*, 113, 108254. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108254>

Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., & Kimura, T. (2005). Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology*, 22(6), 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.002>

- Kurohara, T., Tatebe, C., Fujiwara, Y., Hioki, F., Takada, S., Tada, A., & Sugimoto, N.** (2025). Ruhemann's Purple Monitoring by UHPLC/MS/MS for Ninhydrin Test. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 66(1), 12–18. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.66.12>
- Lanctôt, K. L., Herrmann, N., Mazzotta, P., Khan, L. R., & Ingber, N.** (2004). GABAergic function in Alzheimer's disease: Evidence for dysfunction and potential as a therapeutic target. *Drugs & Aging*, 21(11), 733–768. <https://doi.org/10.2165/00002512-200421110-00003>
- Li, H., Qiu, T., Huang, G., & Cao, Y.** (2010). Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microbial Cell Factories*, 9, 85. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-85>
- Li, H., Qiu, T., Huang, G., Wang, X., & Cao, Y.** (2022). Enhanced GABA production by lactobacilli and its potential health effects. *Frontiers in Microbiology*, 13, 820934. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.820934>
- Luppi, P. H., Peyron, C., & Fort, P.** (2017). GABAergic mechanisms in sleep. *Sleep Medicine Reviews*, 31, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2016.01.002>
- Mäkelä, N., Pylkkänen, L., Mantere, T., Mättö, J., & von Ossowski, I.** (2022). Thiamine biosynthesis in lactic acid bacteria: Potential for food fortification. *Microbial Biotechnology*, 15(2), 549–560. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13971>
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A.** (2018). *Brock Biology of Microorganisms* (15th ed.). Pearson Education. ISBN 978-1-292-23510-3
- Makarova, K. S., Slesarev, A., Wolf, Y. I., Sorokin, A., Mirkin, B. G., Koonin, E. V., Pavlov, A. R., Pavlova, N. V., Karamychev, V. N., Polouchine, N. N., Shakhova, V. V., Grigoriev, I. V., Lou, Y., Rohksar, D. S., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., ... & Mills, D. A.** (2021). Comparative genomics of the lactic acid bacteria: Taxonomy, metabolism and evolution. *Annual Review of Food Science and Technology*, 12, 309–339. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111820-064427>
- Martino, M. E., Bayjanov, J. R., Caffrey, B. E., Wels, M., Joncour, P., Hughes, S., Gillet, B., Kleerebezem, M., van Hijum, S., & Leulier, F.** (2022). Taxonomy and applications of *Lactobacillus* and associated genera. *Trends in Microbiology*, 30(3), 201–215. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.10.008>
- Michel, M. C., & Hannequart, G.** (1968). Dosage des acides aminés et amines par la ninhydrine. Amélioration pratique. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 8(4), 557–563. <https://hal.science/hal-00896443/> fhal-00896443f HAL Id: hal-00896443 <https://hal.science/hal-00896443v1> Submitted on 11 May 2020
- Monteiro, C. R., da Silva, T. M., Santos, E. S., de Souza, E. L., & Magnani, M.** (2022). Biosynthesis of pyridoxine by lactic acid bacteria isolated from fermented cassava products. *Microorganisms*, 10(5), 964. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050964>
- Möhler, H.** (2012). The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology*, 62(1), 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.040>
- Mokhtari S.** (2016). *Effet protecteur de certaines bactéries lactiques isolées de blé fermenté type hamoum*, 165 thèse magister, faculté des sciences ; université Oran.

MERABTI, R., F. BEKHOUCHE, V. CHUAT, M.N. MADEC, M.B. MAILLARD, S. BAILLY, ET AL. 2015. A large diversity of lactic acid bacteria species is involved in the fermentation of wheat used for the manufacture of lemzeiet. *European Food Research and Technology* 241: 137– 149.

N – R

Nuss, P. (2015). Anxiety disorders and GABA neurotransmission: A disturbance of modulation. *Neuropsychiatrie, Sciences du Comportement et Neurologie*, 13(1), 5–15.

Oldak, A., Zielińska, D., & Łepecka, A. (2017). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Applications in food preservation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), 2923–2937. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077190>

OUHAB, A., BENATMANE, N. (2018). *Isolement, caractérisation et étude de certaines activités fonctionnelles des bactéries lactiques du blé dur fermenté du « matmor » de la région de Relizane.*

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique. Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie. Spécialité: Biotechnologie microbienne. Université Ibn Khaldoun –Tiarret-

Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lawlor, J. B., Lemos, J. A., Linares, D. M., Ross, P., Stanton, C., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., & Kok, J. (2019). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83(3), e00084-18. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00084-18>

Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2020). *Microbiology* (11th ed.). McGraw-Hill Education. ISBN 978-1-259-28159-4.

Purwana, I., Zheng, J., Li, X., Deurloo, M., Son, D. O., Zhang, Z., & Li, J. (2014). GABA promotes human β -cell proliferation and modulates glucose homeostasis. *Diabetes*, 63(12), 4197–4205. <https://doi.org/10.2337/db14-0104>

Qiao, N., Li, Y., Wang, Y., Song, Y., Liu, Y., & Wang, J. (2022). A comparative genomics perspective of lactic acid bacteria classification. *Microbiological Research*, 258, 126974. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126974>

Rekha, C. R., Poornachandra Rao, R., & Karthikeyan, S. (2023). Niacin biosynthesis by lactic acid bacteria and its role in nutrition. *Food Bioscience*, 52, 102324. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102324>

Russo, P., Arena, M. P., Fiocco, D., Capozzi, V., & Spano, G. (2020). Biofortification of dairy products with riboflavin using food-grade lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 8873–8883. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10885-4>

S–Z

Santos-Espinosa, A., Beltrán-Barrientos, L. M., Reyes-Díaz, R., et al. (2020). Production d'acide gamma-aminobutyrique (GABA) dans le lait fermenté par des souches spécifiques de bactéries

lactiques sauvages isolées de fromages artisanaux mexicains. *Annals of Microbiology, 70*, 12. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01542-3>

Schousboe, A., Bak, L. K., & Waagepetersen, H. S. (2014). Astrocytic control of biosynthesis and turnover of the neurotransmitters glutamate and GABA. *Frontiers in Endocrinology, 5*, 102. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00102>

Shimada, M., Mochizuki, M., Noguchi, T., & Ohba, K. (2009). Antihypertensive effect of γ -aminobutyric acid (GABA)-rich fermented milk in mildly hypertensive patients. *European Journal of Clinical Nutrition, 63*(4), 490–497. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2008.9>

Siragusa, S., et al. (2007). *Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses.* **Applied and Environmental Microbiology**, 73(22), 7283–7290. <https://doi.org/10.1128/AEM.01064-07>

Soltani, N., Qiu, H., Aleksic, M., Glinka, Y., Zhao, F., Liu, R., & Wheeler, M. B. (2011). GABA exerts protective and regenerative effects on islet beta cells and reverses diabetes. *Cell, 142*(2), 293–307.

Sun, Z., Zhang, W., Yu, D., Liu, W., Wu, Z., Chen, X., & Zhang, H. (2022). Diversity and salt tolerance of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods: Potential application in high-salt environments. *Journal of Applied Microbiology, 132*(5), 3417–3430. <https://doi.org/10.1111/jam.15518>

Takayoshi, T., Masafumi, N., Moeko, O., Masafumi, M., Yasuyuki, M., Takanori, K., & Masanori, S. (2010). Établissement d'un système de fermentation efficace de l'acide gamma-aminobutyrique par une bactérie lactique, *Enterococcus avium* G-15, isolé des feuilles de carotte. *Biological and Pharmaceutical Bulletin, 33*(10), 1673–1679. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.1673>

Tavares, R. F., Dias, R. S., de Castro, R. J. S., & de Oliveira, M. N. (2022). GABA production in cheese by **Lactiplantibacillus plantarum** L10-11. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* <https://www.scielo.br/j/babt/a/MHY8QFgFRLZQXQ6hxNpYr8F>

Treiman, D. M. (2001). GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia, 42*(Suppl 3), 8–12. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.00004.x>

Tuo, Y., Wang, Y., Pang, H., Zhang, T., Jin, Y., & Wu, R. (2022). Cobalamin production by lactic acid bacteria and **Propionibacterium** spp.: From biosynthesis to applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 62*(19), 5350–5363. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1879710>

- Wafford, K. A., & Ebert, B. (2008). Gaboxadol—A new awakening in sleep. **CNS Neuroscience & Therapeutics*, 14*(4), 263–269. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2008.00043.x>
- Wang, Y., Tuo, Y., Mu, D., & Wu, R. (2020). Folate-producing lactic acid bacteria and their potential in functional food development. **Current Opinion in Food Science*, 32*, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.01.003>
- Wan-Mohtar, W.A.A.Q.I.; Sohedein, M.N.A.; Ibrahim, M.F.; Ab Kadir, S.; Suan, O.P.; Weng Loen, A.W.; Sassi, S.; Ilham, Z. Isolation, Identification, and Optimization of γ -Aminobutyric Acid (GABA)-Producing *Bacillus cereus* Strain KBC from a Commercial Soy Sauce *moromi* in Submerged-Liquid Fermentation. *Processes* **2020**, 8, 652. <https://doi.org/10.3390/pr8060652>
- Wells, J. M., Mercenier, A., & van Sinderen, D. (2021). Lactic acid bacteria as probiotics and antimicrobial producers: From molecules to cells and to applications. **Microbial Cell Factories*, 20*, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01555-0>
- Whitman, W. B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Ludwig, W., ... & Parte, A. (Eds.). (2012). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** (2nd ed., Vol. 5: The Actinobacteria). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4>
- Wuyts, S., Wittouck, S., De Boeck, I., Allonsius, C. N., Pasolli, E., Segata, N., & Lebeer, S. (2017). Large-scale phylogeny and genome analysis of the **Lactobacillus casei** group highlights taxonomic inconsistencies and reveals novel clade-associated features. **Frontiers in Microbiology*, 8*, 2104. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104>
- Yahiaoui, Z., Bouziani, K., Belaid, A. (2018).** *Isolement, caractérisation et étude de certaines activités fonctionnelles des bactéries lactiques du blé dur fermenté du « Matmor » de la région de Tiaret*. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique; Spécialité: Biologie moléculaire et cellulaire. Filière: "Sciences Biologiques.Université Ibn Khaldoun –Tiaret-
- Yamatsu, A., Yamashita, Y., Pandharipande, T., Maru, I., Kim, M., & Kim, Y. (2016). Oral intake of γ -aminobutyric acid affects mood and activities of central nervous system in humans. **Food Science and Biotechnology*, 25*, 547–551. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0076-4>
- Yao, Y., Song, Y., Wang, X., Wang, S., Liu, Y., & Zhang, B. (2023). Role and mechanism of microbial GABA production in fermented foods. **Current Opinion in Food Science*, 51*, 100961. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.100961>
- Zhang, J., Zhao, Y., Bai, Y., Wu, Y., & Liu, L. (2023). GABA production by **Lactiplantibacillus plantarum** Y7 in co-culture fermentation with **Streptococcus thermophilus**. **Frontiers in Microbiology*, 14*, 10301410. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10301410>

Références

Zhang, Y., Zhou, H., Zhou, Y., Zhang, J., & Liu, W. (2021). Riboflavin biosynthesis and regulation in lactic acid bacteria: Insights for food biofortification. *Journal of Dairy Science*, 104*(12), 12654–12665. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20314>

Zhao, A., Wang, L., Fu, Y., Li, Z., Liu, H., Liu, M., Zhang, L., Zhao, L., & Wang, H. (2022). Enhancement of GABA production by lactic acid bacteria and its functional properties in fermented foods: A review. *Food Chemistry*, 377*, 131976. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131976>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70*(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Annexe 1 : Composition des milieux de culture

Milieu MRS

Peptone.....	10g
Extrait de viande.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Glucose.....	20g
Tween 80.....	1ml
Phosphate bi potassique.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Citrate d'ammonium.....	2g
Sulfate de magnésium.....	0,2g
Sulfate de manganèse	0,5g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
Autoclavage 15 minutes à 120°C.	

bouillon M17 pour un litre de milieu :

Tryptone:	2,5 g
Peptone pepsique de viande:	2,5 g
Peptone papaïnique de soja:	5,0 g
Extrait de viande:	5,0 g
Extrait autolytique de levure:	2,5 g
Acide ascorbique:	0,5 g
Glycérophosphate de sodium (ou bêta-glycérophosphate de sodium):	19,0 g
Sulfate de magnésium:	0,25 g
Eau distillée.....	1000ml
Autoclavage 15 minutes à 120°C.	

ADH (milieu pour mise en évidence de l'arginine déshydrogénase)

L'arginine.....	5g
Extrait de levure.....	3g
Glucose.....	1g
Chlorure de sodium.....	5g
Pourpre de bromocrésol.....	16g

PH=6,3 ; autoclavage 10 minutes à 120°C, avec l'ajout d'une solution stérile de sucre à 10%.

Citrate de Simmons

Citrate de sodium.....	1g
Bleu de bromothymol.....	0.08g
Chlorure de sodium.....	5g
Sulfate de magnésium.....	0.2g
Hydrogénophosphate de potassium.....	1g
Dihydrogène orthophosphate de sodium.....	1g
Agar-agar.....	15g

PH= 6.9

LDC

Extrait de levure.....	3g
L-ornithine , L-lysine (monochlorhydrate)	
L-arginine.....	5g
Glucose.....	1g
Bromocrésol pourpre.....	0,16g
Ethanol	1g
Chlorure de sodium.....	5g

Bouillon de Clark et Lubs

Peptone.....	10g
Phosphate bi potassique.....	2g
Glucose.....	5g

Mannitol-mobilité

Peptone.....	20g
Nitrate de potassium.....	1g
Mannitol.....	2g
Rouge de phénol.....	40g
Gélose.....	4g

PH=8,1 ; autoclavage 15 minutes à 120°C.

TSI (gélose triple sugar-iron agar)

Peptone.....	20g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3g
Chlorure de sodium.....	5g
Glucose.....	1g
Lactose.....	10g
Saccharose.....	10g
Citrate de fer.....	0,5g
Hyposulfite de sodium.....	0,5g
Rouge de phénol.....	0.25g
Gélose.....	12g
PH=7,4 ; autoclavage 15 minutes à 115°C en position semi-inclinée.	

VF (milieu viande-foie gélosé)

Extrait de viande-foie.....	30g
Glucose.....	2g
Gélose.....	6g
PH=7,4 ; Répartir en tubes à essais.	

Lait gélose

Lait écrémé.....	1L
Gélose.....	15g

Annexe 2 : Cellule bactérienne non identifiées biochimiquement on suppose qu'elle est de genre lactobacillus

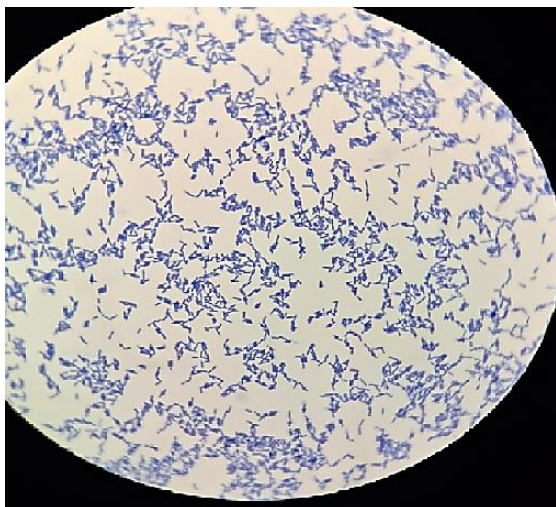


Figure 50: Observation microscopique :
Bacille GRAM+ non sporulée



Figure 50: Test oxydase et catalase négative

Résumé:

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des bactéries lactiques (BAL) productrices de GABA (acide γ -aminobutyrique), un neurotransmetteur aux effets bénéfiques reconnus sur la santé humaine. Des souches bactériennes ont été isolées à partir de blé fermenté de type *hamoum*, un produit traditionnel riche en diversité microbienne. L'objectif principal a été de cribler les souches lactiques capables de produire du GABA, d'évaluer leur rendement et d'optimiser les conditions de production. Les résultats obtenus ont permis d'identifier plusieurs souches prometteuses, mettant en lumière le potentiel biotechnologique du patrimoine fermentaire local. Cette étude ouvre des perspectives pour la formulation d'aliments fonctionnels enrichis naturellement en GABA.

Mots-clés : GABA, bactéries lactiques, blé fermenté, hamoum, fermentation traditionnelle, aliments fonctionnels

Abstract:

This study focuses on the valorization of gamma-aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria (LAB), a group of microorganisms known for their health-promoting properties. LAB strains were isolated from *hamoum*-type fermented wheat, a traditional cereal product with rich microbial diversity. The main objective was to screen and identify GABA-producing strains, assess their production capacity, and optimize the fermentation conditions. The results revealed several promising strains, highlighting the biotechnological potential of local fermented foods. This research paves the way for the development of naturally GABA-enriched functional foods.

Keywords: GABA, lactic acid bacteria, fermented wheat, hamoum, traditional fermentation, functional foods.

الملخص:

يَندرج هذا العمل في إطار تثمين البكتيريا اللبنية (BAL) المُنتجة لحمض الغاما-أمينوبوتيريك (GABA) ، وهو ناقل عصبي معروف بفوائده الصحية المتعددة على الإنسان. تم عزل سلالات بكتيرية انطلاقاً من القمح المخمر من نوع "الحَموم" وهو منتج تقليدي غني بالتنوع الميكروبي. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة كان انتقاء السلالات اللبنية القادرة على إنتاج حمض GABA ، تقييم مردودها والعمل على تحسين شروط الإنتاج. سمحت النتائج المتحصّل عليها بالتعرّف على عدة سلالات واعدة، مما يبرز الإمكانيات البيوتكنولوجية للتراث التخميري المحلي. وتفتح هذه الدراسة آفاقاً جديدة لتطوير أغذية وظيفية مدعمة طبيعياً بحمض GABA .

الكلمات المفتاحية: حمض GABA ، البكتيريا اللبنية، القمح المخمر، الحَموم، التخمر التقليدي، الأغذية الوظيفية.