

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
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 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 et soutenu publiquement par

- Yahiaoui Zohra

-Bouziani Kheira

-Belaid Asmaa

Isolement, caractérisation et étude de certaines activités fonctionnelles des bactéries lactiques du blé dur fermenté du « Matmor » de la région de Tiaret

Jury Grade:

-Président : Mlle. AIT ABDERRAHIM L.

Maitre de conférences B

-Promoteur : Mlle. BOUBAKEUR B.

Maitre de conférences B

-Examineur : Mme. KHADEM H.

Maitre assistante A

Année universitaire : 2017–2018

Remerciement

Nous remercions Dieu qui nous a guidé tout le long de notre chemin afin de réaliser ce modeste travail *et qui nous a donné le courage et la volonté de l'achever et c'est avec beaucoup de respect et d'estime que nous remercions notre promotrice Mme BOUBAKEUR BADRA pour sa confiance, ses précieux conseils, son aide bénéfique en assurant la direction scientifique de ce travail et qui a pris le temps de nous faire profiter avec patience de son expérience et ses connaissances malgré ses nombreuses occupations On exprime à son égard nos profondes gratitudee.*

Nos remerciements sont adressés aux membres de jury qui ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail :

Mme. AIT ABD RRAHIM et Mme. KHADEM HAFIDHA.

Nous remercions *les enseignants de notre parcours pour leurs efforts consentis au cours de notre formation*

Nous remercions tous les ingénieurs des laboratoires de la faculté des de la nature et de la vie particulièrement Mme Kheira.

Enfin, nous remercions tous, qui ont participé de près et de loin à la réalisation de notre travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à toute ma famille en particulier à mes parents qui m'ont beaucoup aidé grâce à leurs précieux conseils, leurs amours démesurés, leurs présences dévouées et leurs confiances rassurantes.

Je dédie aussi ce mémoire à mon frère Abd el ouahab et mes sœurs Amina, Rahma et Chifaa qui m'ont énormément supportée et qui n'ont jamais cessé de me soutenir.

A mes collègues : Zohra, Kheira

A tous mes amis(es) Asmaa, Hayat, Amina

Asmaa

Dédicace

*Je m'incline devant Dieu Tout - Puissant qui m'a ouvert la porte du
savoir et
m'a aidé à la franchir.*

Je dédie ce modeste travail:

*A ma mère (Fatma), source d'affectation de courage et
d'inspiration qui a autant sacrifié pour me voir atteindre ce jour.*

*A mon père (Sahraoui), source de respect, en témoignage de ma
profonde reconnaissance pour tout l'effort et le soutien incessant qui
m'a toujours apporté*

*A mes frères Halim, Ali, Maamar, Abdelkader et petit frère Saïf
Eddine*

*A mes sœurs Cherifa, Mokhtarria, Malika, Zoubida, Halima et ma
petite sœur Imene .*

A mes amies Riála, Khaldia, Ilhem , Samira

A mes collègues Zohra ,Asmaa, Abdelhak et Nouredine.

Kheira

Dédicace.

Je dédie ce modeste travail:

A mes chers parents pour l'amour et la confiance qu'ils ont toujours portés pour moi.

A mes frères Noureddine et Khaled

A mes sœurs Ahlem, Nacera

A mes collègues Kheira, Asmaa, Abdelhak et Noureddine que je leur souhaite une longue et heureuse vie pleine de joie, de réussite, et de bonnes surprises.

A mes amis Somia, Mebarka, et Zahia, Khaldia, Samira, Ilhem.

Zohra

Liste des abréviations

ADH : Arginine d'hydrolase

CRAPC : Centre de Recherche Scientifique & Technique en Analyse physico-chimique

CV: Cristal violet

DO : Densité optique

EPS : Exo polysaccharides

FAO: Food *and* Agriculture Organization

HCL : Chlorure d'hydrogène sulfure d'hydrogène H₂S

LAB: Lactic Acid Bacteria

LDC : Lysine décarboxylase

MRS: Man Rogosa Sharpe

NAOH : Hydroxyde de sodium

OMS : Organisation *mondiale de la Santé*

ONPG : Orthonitrophényl-β-D-galactosipyranoside

ODC : Ornithine décarboxylase

PCA : Plat Count Agar

RM : Rouge de méthyle

TSI : Triple Sugar-Iron agar

VF : Viande-foie

VP : Voges-Proskauer

Liste des tableaux

Tableau N°01 : Principaux genres des bactéries lactiques	07.
Tableau N° 02 : Familles constituant le groupe phylogénétique des bactéries lactiques	08.
Tableau N°03 : Principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques	10.
Tableau N°04 : Appareillages, Verreries et produits chimiques utilisés	16.
Tableau N°05 : Caractères cultureux et microscopiques de la flore totale.....	28.
Tableau N° 06 : Caractères cultureux et microscopiques de la flore lactique.....	32.
Tableau N°07 : Biofilm des cinq isolats lactiques	37.
Tableau N° 8 : Activité protéolytique des 5 isolats lactiques.....	40.

Liste des figures

Figure N°01 : Grains de blé et une MATMORA	06.
Figure N°02 : Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm.....	12.
Figure N°3 : Schéma récapitulatif des démarches expérimentales	17.
Figure N° 04 : Secteurs statistiques représentant les fréquences de consommation de hamoum selon différents critères.....	26.
Figure N° 05 : Quantification de biofilm des cinq isolats.....	38.
Figure N° 06 : Capacité d'agrégation des isolats.....	38.

Liste des photos

Photo N° 01 : Echantillon de blé fermenté utilisé15.

Photo N°02 : Echantillon séparé en quatre et deux parties égales par la méthode de cône.....
.....25.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Introduction

Chapitre I : Etude bibliographique

I.Céréales.....	03.
I.1. Types et technologies de fermentation des céréales.....	03.
I.2. Exemple d'aliment et de boissons fermentées à base de céréales	04.
I.2.1. Boissons fermentées traditionnelles.....	04.
I.2.2. Aliments fermentés traditionnels.....	04.
I.2.2. 1. Pozol.....	04.
I.2.2. 2. Ogi.....	04.
I.2.2. 3. Kenkey.....	04.
I.2.3. Blé fermenté	05.
I.3. Implication des bactéries lactiques dans la fermentation des céréales.....	06.
I.4. Taxonomie des bactéries lactiques.....	08.
I.5. Vertus thérapeutique des bactéries lactiques.....	09.
I.6. Exemple de bactéries lactiques impliquées dans la fermentation des céréales.....	11.
I.7. Activités d'intérêt industriel des LAB.....	11.
I.7.1. Propension à s'organiser en biofilm.....	11.
I.7.2. Activité protéolytique.....	13.
I.7.3. Activité lipolytique.....	13.
I.7.4. Activité Amylolytique.....	13.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.1. Objectif du Travail.....	14.
II.2. Lieux et période de travail.....	14.
II.4. Matériel.....	15.
II.4.1.Echantillon de blé fermenté.....	15.
II.4.2. Appareils, Verreries et produits chimiques.....	16.
II.5. Méthodes.....	17.
II.5.1.Protocole expérimental.....	17.
I.5.2.Choix de la matière végétale.....	18.
II.5.3.Echantillonnage.....	18.
II.5.4. Etablissement d'un questionnaire.....	18.
II.5.5. Préparation des échantillons.....	18.
II.5.5.1. Purification et Triage.....	18.
II.5.5.2. Séchage et broyage.....	18.
II.5.5.3. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales.....	19.
II.5.6. Analyse microbiologique.....	19.
II. 6.1. Isolement des bactéries lactiques	19.
II.5.6.2. Identification biochimique des bactéries lactiques.....	19.
II.5.7. Conservation des souches bactériennes.....	23.
II.5.8. Etude de certaines activités fonctionnelles des isolats lactiques.....	23.
II.5.8.1. Capacité d'auto-agrégation.....	23.
II.5.8.2. Capacité de formation de biofilm.....	23.
II.5.8.3. Activité protéolytique.....	24.

Chapitre III :Résultats et Discussion

III.1. Fractionnement de l'échantillon.....	25.
III.2. Etablissement de questionnaire.....	26.
III. 3. Analyse microbiologique.....	27.
III.4. Formation de biofilm et capacité d'agrégation.....	36.
III.5. Capacité d'agrégation.....	39.
III.6. Activité protéolytique	41.
Conclusion.....	43.
Références bibliographiques.....	44.
Annexes.....	56.
Resumé	

INTRODUCTION

Les aliments fermentés traditionnels contribuent à environ un tiers de l'alimentation dans le monde entier (**Haard et al., 1999**). La fermentation est un procédé ancestral et l'une des méthodes économiques les plus utilisées dans la conservation et la transformation des matières premières alimentaires. Elle prolonge leurs durées de vie, en éliminant les facteurs toxiques et antinutritionnels.

Les produits fermentés à base de céréales, par leur richesse nutritionnelle, constituent une épine dorsale de système alimentaire. La majorité des produits céréaliers en Afrique ont subi des fermentations et utilisées comme des aliments de sevrage pour les nourrissons et comme des aliments de base pour les adultes (**Osungbaro, 2009**).

Du fait de leur physiologie métabolique, les bactéries lactiques pourraient dominer la fermentation des céréales. Leurs principales fonctions comprennent : la production d'acides organiques et de composés aromatiques, l'inhibition des microorganismes pathogènes, les propriétés probiotiques, l'élaboration de la texture de l'aliment et la dégradation des composés toxiques (**Yao et al., 2009**). Ces bactéries confèrent aux céréales et leur dérivées des propriétés organoleptiques et nutritionnelles (**Merabti et al., 2015**).

En Algérie et dans certaines régions, le blé dur est fermenté dans des silos souterrains appelés « MATMOURA ». Ce blé fermenté, utilisé pour la fabrication d'un type de couscous, a reçu une attention scientifique importante liée à ses biofonctionnalités et la biodiversité de la flore microbienne impliquée dans sa fermentation traditionnelle ou contrôlée (**Djermoun, 2009**).

Le blé fermenté de MATMORA, qui est un produit local abrite divers microorganismes dont les LAB. Ce produit reste sommairement caractérisé de point de vue microbiologique, biodiversité de bactéries lactiques et biofonctionnalité. Ainsi notre travail visait l'étude visait la caractérisation d'une partie de la flore lactique impliquée dans la fermentation de blé

Ce document comporte une partie bibliographique, une étude expérimentale, une conclusion et une exposition des perspectives envisageables pour approfondir les connaissances sur l'écosystème du blé fermenté et également sur les interactions bactériennes en vue d'améliorer sa qualité et de sélectionner des cultures starters efficace pour une bonne fermentation contrôlée des céréales.

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

Les céréales sont la matière première la plus utilisée dans le processus de la fermentation dans le monde ; la plus grande partie des aliments fabriqués issue des processus de fermentation ou elle est impliquée au moins à un stade de leur génération (**Hammes et Ganzle, 1998**).

La fermentation est un processus ancestral et l'une des méthodes les plus économiques de conservation et de transformation des matières premières alimentaires. Elle améliore la qualité des produits alimentaires non seulement en prolongeant leur durée de conservation par l'élimination des facteurs toxiques et antinutritionnels mais aussi en améliorant le développement des saveurs et en augmentant la valeur nutritionnelle des aliments (**Merabti et al. 2015**). Comme avec tout autre processus de fermentation, la compréhension de l'écologie microbienne des fermentations céréalières nécessite la connaissance des substrats de fermentation ; c'est-à-dire la composition et les caractéristiques physicochimiques des matières premières ainsi que les produits obtenus en étudiant la caractérisation des associations microbiennes et des facteurs écologiques, déterminés par nature du substrat céréalière, qui régissent le processus de la fermentation. Dans les fermentations céréalières, les enzymes endogènes, les bactéries, les levures et les moisissures jouent un rôle singulier ou combiné et contribuent à la création d'une grande variété de produits (**McGee, 1984**).

I.1. Types et technologies de fermentation des céréales

Van Beek et Priest (2002); Verachtert et Debourg (1995) ; Back (1994) ont indiqué que la gestion des activités hydrolytiques nécessaires pour obtenir les hydrates de carbone fermentescibles nécessite des besoins technologiques spécifiques. Quatre technologies de base peuvent être identifiées, à savoir :

- **Le maltage** permettant la gestion des activités endogènes ;
- **La technologie « Koji »** qui se repose sur l'utilisation des activités physiologiques des champignons ;
- **Utilisation d'activités hydrolytiques provenant** de bactéries, de plantes ou de salive humaine ;
- **Fermentation de la pâte (pâte à frire ou gruau)** est une technologie adoptée pour la production d'éthanol et des boissons alcoolisées.

I.2. Exemple d'aliment et de boissons fermentées à base de céréales

I.2.1. Boissons fermentées traditionnelles

Il existe plusieurs types de boissons fermentées à base de céréales, produites dans le monde entier, qui peuvent être classées en fonction des matières premières utilisées ou de type de fermentation intervenant dans le processus de fabrication. Les boissons fermentées peuvent être classées dans des catégories ; la catégorie des boissons alcoolisées et celle des boissons non alcoolisées qui constitue la grande partie (**Chavan et Kadam, 1989 ; Fleet, 1998**).

I.2.2. Aliments fermentés traditionnels

I.2.2. 1. Pozol

Pozol est une pâte de maïs fermentée. Il est consommé dans le sud-est du Mexique par les Indiens et les groupes métis. Pour sa préparation, les grains de maïs grossièrement broyés doivent être bouillis dans de l'eau chaude. La pâte obtenue est malaxée afin de former une boule compacte qui est enveloppée par des feuilles de bananier. Il peut être laissé à température ambiante de quelques heures à plusieurs jours ou même plus d'un mois. Un mélange de bactéries lactiques qui est incorporée principalement pendant le processus de broyage est à l'origine de la fermentation de la pâte (**Nanson et Field, 1984 ; Wachter, 1993**). *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus alimentarius*, et *Clostridium* sp. ont été isolés à partir du pozol (**Escalant et al., 2001**).

I.2.2. 2. Ogi

L'Ogi est un gruau de céréales fermentées à base de maïs, bien que le sorgho ou le millet soient également employés comme le substrat de sa génération. On considère qu'il s'agit une importante nourriture de sevrage pour les nourrissons mais il est aussi consommé par les adultes (**Banigo, 1993 ; Moss et al., 1993 ; Onyekwere, et al., 1993**). Les bactéries lactiques, les levures et les moisissures sont à l'origine de sa fermentation, bien que *Lactobacillus plantarum* soit le micro-organisme prédominant (**Caplice et Fitzgerald, 1999**).

I.2.2. 3. Kenkey

Kenkey est une pâte de maïs fermentée consommée au Ghana. La fermentation est dominée par une variété de bactéries lactiques, en particulier *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus fermentum L. reuteri* (**Halm et al., 1993**). Les levures et les moisissures (*Candida*, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium*) contribuent également au développement de la saveur de ce produit (**Jespersen et al, 1994**).

I.2.3. Blé fermenté

Lorsque les besoins alimentaires augmentent au fil de temps, il est bon de se tourner vers des aliments nutritionnels particulièrement les céréales qui regroupent le blé, le seigle, l'orge .. etc. En Algérie, les produits céréaliers occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale. Cette caractéristique est perçue d'une manière claire à travers toutes les phases de la filière alimentaire céréalière (**Djermoun, 2009**). Les céréales sont définies comme des graines amylacées (riches en amidon) pouvant être transformées en farines et semoules à usage alimentaire dont le blé est l'espèce la plus représentative. Les graines céréalères exercent des effets bénéfiques pour les consommateurs grâce à leur valeur nutritionnelle bien qu'elles soient déficientes en acides aminés et vitamines dont la valeur peut être augmentée par fermentation microbienne naturelle ou contrôlée qui permet tout particulièrement l'amélioration de la digestibilité et de la qualité du microbiote intestinal de l'hôte (**Aubert, 1985**). A la différence des légumes et des fruits et d'autres aliments susceptibles à l'altération, qui doivent être rapidement consommés, les céréales peuvent être stockés mais doivent être préparés de sorte qu'ils soient agréables à consommer après stockage (**Jeanet et al. 2006**). Le stockage des graines est une opération complexe qui demande la prise en compte de multiples paramètres (température, humidité, etc.) lors des différentes étapes, entre la récolte et l'expédition (**Zouaoui, 2011**). Les premiers systèmes de stockage étaient de grands paniers faits de roseaux ou fioles d'argiles qui sont enfoncées dans le sol, ainsi que des puits, des structures de bois et des puits garnis de paille (**Druvefords, 2004**). Le stockage souterrain des céréales est une des techniques largement utilisées en milieu rural dans plusieurs régions céréalères. Ce système ancestral est très bien connu pour les avantages qu'il présente : coût réduit, discrétion du stockage, réduction des effets excessifs des variations extérieures de la température, création d'atmosphère confiné et enfin limitation des risques de parasitisme (**Bartali et Debbarh, 1991**).

La trop forte humidité et les eaux d'infiltration sont les inconvénients majeurs de cette méthode de stockage favorisant le développement des moisissures et les phénomènes de fermentations bactériennes naturelles indésirables (**Doumandji et al., 2003**).



Figure 1 : Grains de blé et une MATMORA

I.3. Implication des bactéries lactiques dans la fermentation des céréales

Depuis l'aube de l'humanité, les bactéries lactiques sont employées pour la fabrication et la conservation des aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle mais leur utilisation fut perpétuée sous forme de levain. Au début du 20^e siècle, le terme « bactéries d'acide lactique » (LAB) a été utilisé pour se référer à "organismes acidifiants le lait". Bien que les similitudes entre ces organismes et d'autres bactéries produisant de l'acide lactique ont été rapidement observés, les critères proposés par **Orla-Jensen (1919)**, (la morphologie cellulaire, le mode de fermentation du glucose, la température de croissance, et les voies d'utilisation des sucres) constituent la base de la classification actuelle des LAB (**Wright et Axelsson, 2012**).

Le développement de l'industrie agroalimentaire et en particulier l'utilisation de matière première nouvelles, ainsi que le besoin de créer de nouveaux produits de haute qualité sans l'ajout des composés texturants et stabilisants d'origine végétale ou animale expliquent l'intérêt accru porté à ce groupe de bactéries diverses et à leur métabolites responsables de l'acquisition des propriétés nutritionnelles ou de la qualité organoleptique et sanitaire des aliments (**Novel, 1993; Mozzi et al., 1996**).

Le terme « bactéries lactiques » ne se rapporte pas à une classe phylogénétique d'organismes, mais plutôt aux capacités métaboliques de l'espèce. Les bactéries lactiques sont historiquement définies comme une famille omniprésente et hétérogène de microbes qui peuvent fermenter divers nutriments produisant, principalement, l'acide lactique (**Holzappel et Wood, 1995**). Elles sont caractérisées par la production d'acide lactique à la suite du

métabolisme du sucre qui conduit à une acidification de l'environnement jusqu'à un pH de 3,5 (Charlier et al., 2008).

Les LAB appartiennent aux deux phylums bactériens : Firmicutes et Actinobactéries. Parmi les LAB Firmicutes : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Entérocoques*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella*, *Alloioococcus*, *Symbiobacterium* et *Vagococcus*. Les espèces appartiennent au genre *Bifidobacterium* appartiennent au phylum des Actinobacteria (Tableau 01) (Wedajo, 2015).

Les bactéries lactiques sont des bâtonnets ou des Cocci Gram-positif, non sporulés, non-pigmentés et non-mobiles, dont la plupart sont des anaérobies ou aéro-tolérants, catalase et oxydase négatives. Elles utilisent une ou deux différentes voies métaboliques et cela fournit une fonction de diagnostic utile dans leur classification :

- Les organismes homofermentaires ne produisent que de l'acide lactique issu de la fermentation du glucose par la voie d'Emden-Meyerhof-Paras glycolytique.
- Hétérofermentaires peuvent produire grossièrement des concentrations équimolaires de lactate, éthanol / acétate et carbone dioxyde de glucose.

Tableau N°01 : Principaux genres des bactéries lactiques (Adams et Moss, 1995).

Genres	Morphologie	Fermentation	Isomère de lactate	ADN (% molaire G-C)
<i>Lactococcus</i>	Cocci	Homo	L	33-37
<i>Lactobacillus</i>		Homo	D, L, DL	32-53
<i>Leuconostoc</i>	Rods	Hetero	D	38-41
<i>Streptococcus</i>	Cocci	Homo	L	40
<i>Pediococcus</i>	Cocci	Homo	DL	34-42

Le groupe des bactéries lactiques (LAB) occupe une place centrale dans les processus de la fermentation industrielle, elles ont une longue histoire d'application et de consommation dans la production et la conservation d'aliments et des boissons fermentés (Caplice et Fitzgerald,

1999 ; Ray, 1992 ; Wood, 1997 ; Holzapfel et Wood, 1995). À travers la production d'acides organiques, principalement de l'acide lactique, elles provoquent une acidification rapide de la matière première. Aussi, leurs productions d'acide acétique, d'éthanol, d'arômes, de bactériocines, d'exopolysaccharides et plusieurs enzymes sont importantes. La première production d'aliments fermentés était basée sur la fermentation spontanée en raison du développement de la microflore naturellement présente dans la matière première. Une dépendance caractérise la qualité du produit final à la charge microbienne impliquée dans sa fermentation (Harris, 1998).

I.4. Taxonomie des bactéries lactiques

Il est largement reconnu que la capacité de production d'acide lactique à partir d'hydrates de carbone est une caractéristique commune d'un ensemble de Bactérie à Gram (+) et n'a aucune signification phylogénétique. D'autre part, les arbres phylogénétiques constituent l'épine dorsale des systématiques bactériennes modernes ainsi, taxonomiquement parlant, le groupe des bactéries formant de l'acide lactique est un groupe très hétérogène comporte une vaste gamme de genres et d'espèces distribués dans différentes lignées : la famille Bacillaceae (Zhou et al., 2013). Le tableau ci-dessous représente les différentes familles composant ce groupe phylogénétique qui est constitué d'environ 500 espèces décrites valablement.

Tableau N°02 : familles constituant le groupe phylogénétique des bactéries lactiques (Felis et al., 2016).

Famille	Genres
Aerococcaceae	<i>Abiotrophia, Aerococcus, Dolosicoccus, Eremococcus, Facklamia, Globicatella and Ignavigranum.</i>
Carnobacteriaceae	<i>Alkalibacterium, Allofustis, Alloiococcus, Atopobacter, Atopococcus, Atopostipes, Carnobacterium, Desemzia, Dolosigranulum, Granulicatella, Isobaculum, Lacticigenium, Marinilactibacillus,</i>

	<i>Pisciglobus</i> and <i>Trichococcus</i> .
Enterococcaceae	<i>Bavariicoccus</i> , <i>Catelicoccus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Melissococcus</i> , <i>Pilibacter</i> , <i>Tetragenococcus</i> and <i>Vagococcus</i>
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i> and <i>Pediococcus</i>
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i> , <i>Fructobacillus</i> , <i>Oenococcus</i> , <i>Weissella</i> .
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i> , <i>Lactovum</i> and <i>Streptococcus</i>

I.5. Vertus thérapeutique des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont une grande importance pour l'industrie et sont utilisés dans le monde entier dans un grand nombre de pays grâce à leurs variétés de fermentations alimentaires industrielles (**Mensah, 1997 ; Hugenholtz et Smid, 2002**). Les LAB ont traditionnellement été associée à des fermentations alimentaires humaine et animale, et sont généralement classées dans les flores technologiques et considérés comme microorganismes bénéfiques (probiotiques) (**Colladon et al., 2009**). Le mot probiotique vient du grec signifiant « pour la vie ». La première définition des probiotiques a été décrite par (**Virgin, 1954**). Un an plus tard **Kolb** a proposé que le déséquilibre microbien dans le corps humain résultant de l'antibiothérapie pourrait être restauré par des probiotiques (**Parker en 1974**). **Fuller (1992)**, a défini les probiotiques comme « un complément alimentaire microbien vivant qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal ». Selon les recommandations de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et l'Organisation Mondiale de la Santé (**FAO / OMS, 2002**).), les probiotiques sont considérés comme des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates confèrent un avantage vis-à-vis de la santé de l'hôte. Ces avantages doivent être scientifiquement établies par des études cliniques chez l'animal et l'homme (**Ouwehand et al 2002**). Un certain nombre de genres et de souches de bactéries (*Lactobacillus*, *Bifidobactérium* *Lactococcus* *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *S. salivais* **sp.** *S. thermophilus*, *E. faecium*, *E. faecalis* *E. coli*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. clausii*,) et levure (*Saccharomyces*

cerisaie et boulardi) peuvent être utilisés comme probiotiques principalement dans les productions laitières mais aussi dans la production non laitières comme la brasserie et la fermentation des produits céréaliers (Shah, 2007 ; Prado et al, 2008 ; Tripathi et Giri , 2014).

Les bactéries lactiques sont considérées comme ayant plusieurs effets bénéfiques : effets physiologiques comme l'activité antimicrobienne, l'amélioration de la puissance immunitaire (Kullisaar et al, 2002), la prévention du cancer et l'abaissement du taux de cholestérol sérique (Kaur et al, 2002), la colonisation et le maintien de l'environnement approprié de la microflore intestinale, l'exclusion compétitive des micro-organismes indésirables, interférence microbienne et activités antimicrobiennes, stimulation et modulation du système immunitaire (Klaenhammer, 1995). Les principaux effets santé des LAB sont récapitulés dans le tableau ci-dessous :

Tableau N° 03 : Principaux effets bénéfiques attribués aux probiotiques (Salminen et al., 2004 ; Patterson, 2008)

Effets intestinaux	Effets sur le système immunitaire	Autre effets
-contrôle des troubles suivants : Mauvaise digestion du lactose -Diarrhée associée aux antibiotiques -Syndrome du côlon irritable -Constipation -Infection par <i>Helicobacter pylori</i> -Prolifération bactérienne dans l'intestin grêle -Maladies inflammatoires : chroniques de l'intestin Prévention de l'entérocolite nécrosante du nouveau-né	-Modulation immunitaire -Répression des réactions Allergiques par réduction de l'inflammation -Réduction des risques d'infection par des agents pathogènes courants (<i>Salmonella</i>)	Réduction du risque de : -Certains cancers (colorectal, vessie, col utérin, sein) -Coronaropathie -Maladies de voies urinaires -Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes -Réduction du cholestérol sérique et de la pression artérielle.

I.6. Exemple de bactéries lactiques impliquées dans la fermentation des céréales

Le processus de fermentation de base comprend les activités enzymatiques des *Lactobacilles*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. Ces activités se traduisent par la production d'acides gras à chaîne courte et d'acides organiques tels que les acides lactique, acétique, butyrique, formique, et les acides propénoïques. Le pH de ces aliments est réduit à des valeurs de 4 ou moins (**Mensah, 1997**). Les acides formés au cours du processus de fermentation entraînent l'abaissement du pH et inhibe ainsi la croissance des organismes de détérioration (**Sanni, 1993**). L'activité primaire de la culture dans la fermentation alimentaire est de convertir les hydrates de carbone en métabolites désirés comme l'alcool, l'acide acétique, l'acide lactique ou le CO₂. Les cultures utilisées dans la fermentation des aliments permettent, également par des réactions secondaires, la formation de la saveur et de la texture (**Hansen, 2002**). Les *Lactobacillus* spp. Jouent un rôle important dans le développement de la plupart des céréales fermentées (**Sanni, 1993**). Il a été montré que *Lactobacillus plantarium* et *Pediococcus* spp. Dominent les derniers stades de la fermentation de la pâte de maïs et peuvent donc être à l'origine de l'acidification rapide de la pâte inoculée par un inoculum mixte (**Nche et al., 1994**). La culture des bactéries lactiques et des bactéries propénoïques semble être une alternative potentielle de la longue chaîne alimentaire (**Javanainen et Linko, 1993**).

Dans le cas où les grains de céréales sont utilisés comme milieu naturel pour la fermentation lactique, l'amylase doit être ajoutés avant ou pendant la fermentation. Majoritairement les bifidobactéries amylolytiques sont utilisées car ils produisent suffisamment d'amylase qui est nécessaire pour la saccharification du grain (amidon) (**Kim et al., 2000**).

I.7. Activités d'intérêt industriel des LAB

I.7.1. Propension à s'organiser en biofilm

De nombreux micro-organismes dans l'environnement naturel existent sous forme d'agrégats multicellulaires généralement décrits comme des biofilms, associés à des surfaces solides et en contact étroit avec d'autres cellules microbiennes (**Webb et al., 2003. Stoodley et al., 2002**). Un biofilm est un ensemble de cellules bactériennes qui adhèrent à une surface inerte, organique ou vivante. Les biofilms sont présents partout sur toutes les surfaces. Cette structure biologique est donc composée de cellules agrégées et attachées irréversiblement à une surface entourées d'une matrice de substances polymériques extracellulaires produite par les mêmes cellules, et incluant des composés abiotiques et

non cellulaires (El **azzaoui**, 2011). Les bactéries lactiques sont des composants principaux des biofilms (**Burin Des Roziers**, 2002), cette capacité est attribuée à leur **pouvoir d'agrégation** et de production des **exopolysaccharides (EPS)** qui constituent le ciment de biofilm (**London et al.**, 2016). Selon **Parot (2007)** la constitution d'un biofilm mature passe par plusieurs étapes (**figure02**) :

1. Attachement réversible des bactéries (agrégation ou adhésion primaire) ;
2. Adhésion irréversible et production d'EPS ;
3. Formation des micro-colonies,
4. Maturation du biofilm et mise en place de la structure tridimensionnelle du biofilm,
5. Détachement du biofilm et dissémination.

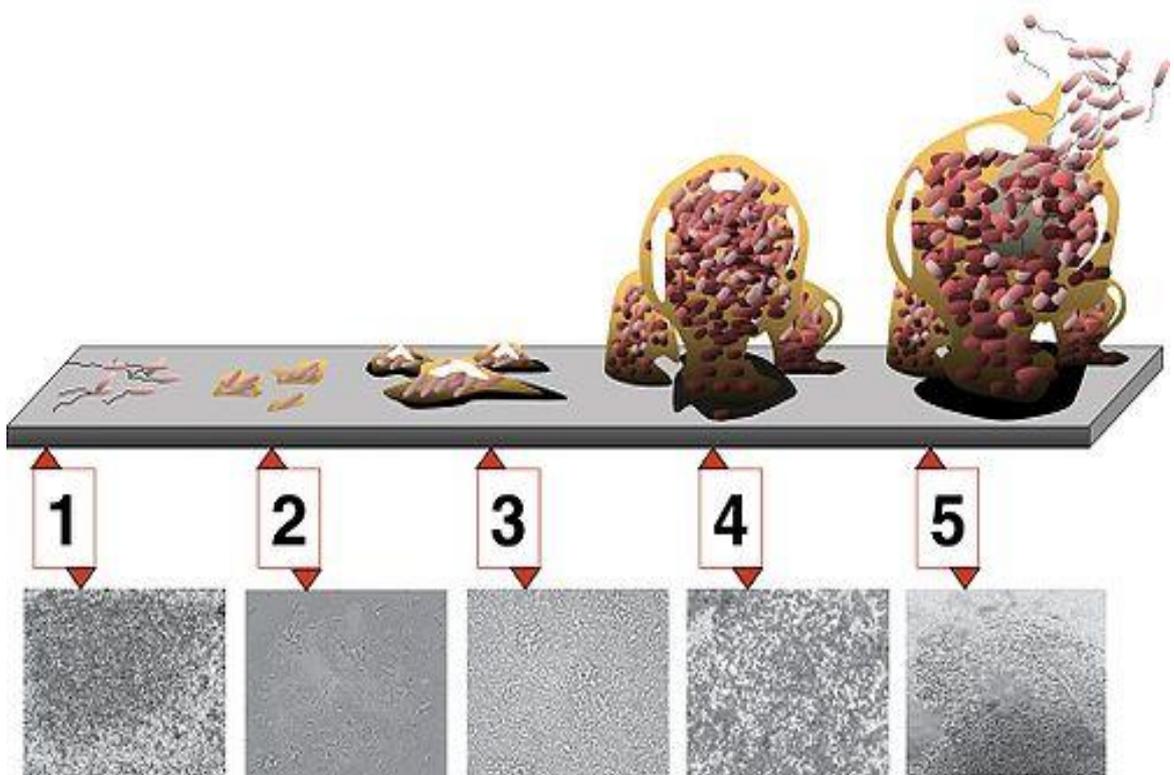


Figure 02 : Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm (**Parot, 2007**).

Les cellules bactériennes constituant le biofilm ont une grande capacité d'assimilation de substrat divers, une résistance accrue aux agents antimicrobiens, une surexpression génétiques d'enzymes et une importante efficacité de production de métabolites d'intérêt (**Stoodley et al.**, 2002).

I.7.2. Activité protéolytique

La protéolyse des bactéries lactiques est considérée comme l'un des plus importants processus biochimique impliqué dans la fabrication de nombreux produits fermentés (**Belkaaloul et al.,2010**). D'autre part les enzymes protéolytiques et peptidolytiques des bactéries lactiques contribuent efficacement aux propriétés organoleptiques des produits fermentés. La protéolyse pourrait également contribuer à prévenir les problèmes d'allergènes fréquents chez les enfants de moins de trois ans en raison d'une mauvaise digestion des protéines (**Pescuna et al.,2009**). Cette activité assure leur croissance dans des milieux à faible concentration en acide aminés libres et oligopeptide comme le lait (**Axelsson, 2004**) Ce système comprend des protéases situées à la surface cellulaire pour briser la caséine en oligopeptides, des protéinases intracellulaires et peptidases intracellulaires pour l'hydrolyse des oligopeptides aux acide aminés (**Chedid, 2007 ; Roudj et al.,2009**).

I.7.3. Activité lipolytique

Les bactéries lactiques possèdent des enzymes lipolytique (les lipases et lyxogénases) capables d'hydrolyser une longue chaîne des acides gras, d'esters, des substrats de tri-di-mono glycérol (**Liu et al., 2001 ; Serhan et al.,2009**). Durant le stockage du blé l'augmentation de teneurs en acide gras libres est due à l'action des lipases présentes dans les graines (**Sallek et al., 2006 ; Carver,2009**). Plusieurs LAB laitiers, y compris *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum* et *Lb. rhamnosus*, ont été signalés à avoir une activité lipolytique considérable (**Cosentino et al., 1999; Di Cagno et al., 2016**). Dans le fromage, cette activité, se produit généralement par l'intermédiaire des systèmes estérase / lipase des LAB, des bactéries propionique, des moisissures et des levures (**Endo et Dicks, 2014**).

I.7.4. Activité Amylolytique

Les LAB possèdent des enzymes capables d'hydrolyser l'amidon (**Amylose et amylopectine**) et ses produits de dégradation (**dextrines et oligosaccharides**). Les enzymes présentes naturellement dans le blé : **α -amylase** joue un rôle important car elles sont responsables de la dégradation de l'amidon en sucres simple (**Sindic et al.,2010**). Dans le blé de haute qualité, le contenu β -amylase est faible (**Cauvain, 2003**).

MATERIELS ET
METHODES

II.1. Objectif du Travail

Cette étude visait la caractérisation d'une partie de la flore lactique impliquée dans la fermentation de blé. Pour ce faire trois objectifs ont été fixés :

- 1.** Etude de la qualité microbiologique du blé fermenté (caractérisation partielle de la flore microbienne de blé dur fermenté).
- 2.** Isolement et étude des caractéristiques phénotypiques et biochimiques de certaines bactéries lactiques impliquées dans la fermentation du blé.
- 3.** Etude de certaines activités fonctionnelles des bactéries lactiques caractérisées : capacité d'agrégation, formation de biofilm et activité protéolytique.

II.2. Lieux et période de travail

Une enquête sur la connaissance et l'appréciation du Hamoum a été conduite dans la ville de Tiaret. L'expérimentation a été réalisée durant la période **de février au mai 2018** dans le :

- Laboratoire pédagogique de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret ;
- Laboratoire de recherche de valorisation des productions animales et locales. Institut des sciences vétérinaires. Université de Tiaret ;
- CRAPC.

II.4. Matériel

II.4.1. Echantillon de blé fermenté



Photo 01 : Echantillon de blé fermenté utilisé (photo prise par auteurs le 27/03/2018).

Les grains de blé dur fermenté de type hamoum ont été utilisés dans notre étude (photo 01).

L'échantillon a été récolté le 20/03/2018 à partir d'un silo de fermentation « MATMORA » dans la région de Frenda dans des sacs en plastiques stériles.

II.4.2. Appareils, Verreries et produits chimiques

Les appareils, la verrerie et les produits chimiques utilisés sont récapitulés dans le tableau 4.

Tableau N° 04 : Appareils, Verreries et produits chimiques utilisés

Appareillage	Verreries	Produits chimiques
PH mètre	Burette	Milieus de cultures
Balance	Tubes à essai	(Gélose et bouillon MRS, PCA, VF, gélose
Centrifugeuse	Dessiccateur	Colombia, gélose Chapman, gélose et bouillon
Agitateur	Béchers	M17, gélose mannitol mobilité, TSI Citrate
Autoclave	Flacons	Simon, clarck &lubs, LDH, ODC, ADH).
Réfrigérateur	Lames	L'eau distillée, l'eau peptonée, l'eau oxygénée,
Incubateur		L'eau physiologique
Bain marie		Colorants de Gram : violet de gentiane, lugol,
Bec bensen		l'alcool, fuschine
Microscope optique		Oxydase, ONPG
Vortex		NAOH, Hcl, Naphtol
		L'extrait de levure
		Glucose
		Glycérol
		Lait écrémé
		Rouge de méthylène
		Cristal violet

II.5. Méthodes

II.5.1. Protocole expérimental

L'ensemble des démarches expérimentales réalisées est illustré par la **figure 3**.

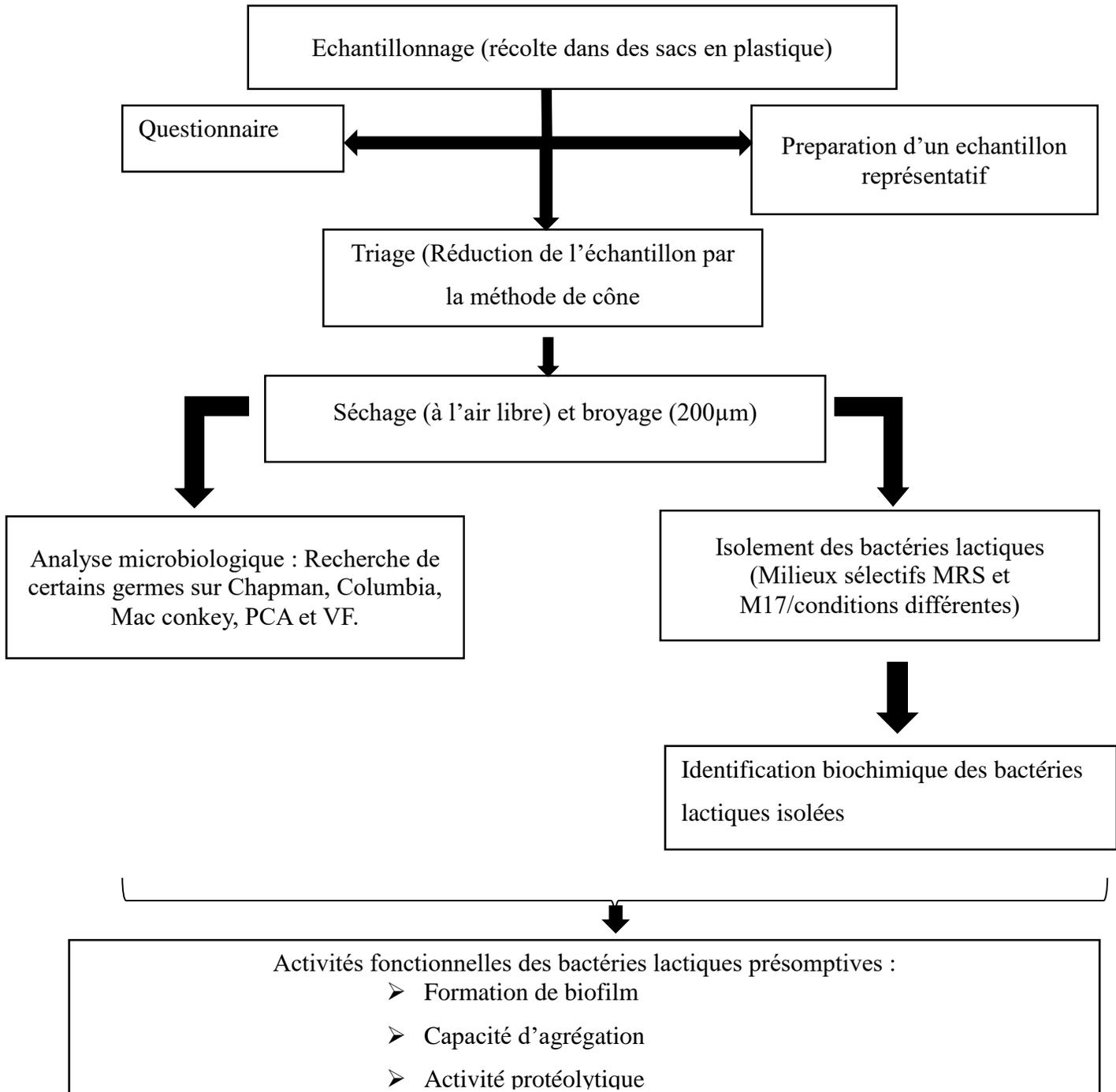


Figure 03 : Schéma récapitulatif des démarches expérimentales

I.5.2. Choix de la matière végétale

Le blé fermenté possède une grande valeur nutritionnelle et des activités biologiques diverses (Anti-diabète, anti-cancer, anti-diarrhée, activité vis-à-vis du transit intestinal et autres), sa production est moins coûteuse et plus enrichissante car les bactéries impliquées, qui présentent des effets santé divers, peuvent améliorer sa qualité nutritionnelle et organoleptique par leur métabolisme diversifié. Peu de travaux ont abordé la biofonctionnalité de la flore de ce produit extrait de l'entrepôt "Matmora". Il nous a donc paru judicieux de faire une étude qui consiste à caractériser une partie de la flore lactique impliquée dans sa fermentation et étudier certaines de leurs atouts et performances d'intérêt biotechnologiques (activité protéolytique, capacité d'agrégation et formation de biofilm total sessile).

II.5.3. Echantillonnage

Le blé, qui nous a été fourni par un agriculteur possédant une matmora, a été récolté à partir de cinq points différents. Au laboratoire les cinq points ont été mélangés pour obtenir un échantillon représentatif homogène. L'échantillon a été nettoyé, purifié puis conservé au froid.

II.5.4. Etablissement d'un questionnaire

Une enquête scientifique a été établie afin de cerner l'appréciation de « Hamoum » comme une matière alimentaire, auprès des personnes adultes, et ses vertus notées par les populations qui le consomment.

II.5.5. Préparation d'échantillon

II.5.5.1. Purification et Triage

L'échantillon représentatif a été trié et réduit en quatre fractions par la méthode de cône. Les fractions ont été conservées dans des flacons de 500ml au froid en vue de leur exploitation.

II.5.5.2. Séchage et broyage

Les quatre parties de l'échantillon ont été séchées à l'air libre pendant 24 heures et le broyage a été réalisé par un broyeur électrique pour obtenir une poudre fine de 200µm. La poudre obtenue a été conservée dans des flacons en plastique à 4°C et à l'obscurité.

II.5.5.3. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales

Pour préparer la solution mère ; 10 g d'échantillon ont été mélangés avec 100 ml d'eau tryptonée. A partir de la solution mère, une série de dilution décimale successive, en utilisant l'eau physiologique, d'ordre 6 (de 10^{-1} à 10^{-6}) a été réalisé.

II.5.6. Analyse microbiologique

Une analyse microbiologique qualitative a été faite, 100 µl de la solution mère sont encemencés, dans des condtions d'aspecie, sur des milieux de cultures sélectifs disponibles : Chapman, Mackonky, Viande foie et des milieux ordinaires : PCA et Columbia.

II. 5.6.1. Isolement des bactéries lactiques

Ces bactéries sont parmi un des groupes bactériens les plus impliqués dans les fermentations naturelles du blé (**Kalui et al., 2010**). Pour déterminer les bactéries lactiques impliquées dans la fermentation de notre échantillon, un isolement dans des géloses M17 et MRS a été effectué à différentes conditions de pH (4.5, 6), de la durée d'incubation (24, 48h), de température (30, 44°C) et d'anaérobiose.

100µl de la solution mère et les différentes dilutions ont étéensemencés sur une gélose préalablement préparée. Les cultures ont été incubées à 30°C et 44°C pendant 24h et 48h. Les cultures sur MRS pour l'isolement sont placées dans des dessiccateurs avec une bougie pour réduire partiellement la pression en O₂. Une appréciation qualitative ou un dénombrement a été fait après 24 et 48h d'incubation.

II.5.6.2. Identification biochimique des bactéries lactiques

Une identification spécifique phénotypique et biochimique présomptive a été réalisée selon les critères préconisés par **Gourgand et al. (1997)** ; **Axelsson (2004)** **Hammes et Hertel (2006)** en notant les caractères morphologiques, visuelles et biochimiques des différents isolats. Les tests réalisés sont :

- **Oxidase**

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé, cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N-diméthyle paraphénylène diamine, ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé violet, noircissement à l'air. La technique a été réalisée selon le protocole de **Marchal et Boudron (1982)** ;

Une colonie bactérienne a été déposée sur une lame contenant une goutte d'eau distillée. Après homogénéisation, un disque d'oxydase a été déposé sur le frottis à l'aide d'une anse stérile. La souche est dite oxydase positif si la couleur change vers le violet et oxydase négative si elle reste blanche.

- **Catalase**

Ce test est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 avec dégagement d' O_2 selon la réaction suivante : $H_2O_2 \rightarrow H_2O + 1/2O_2$ (**Marchal et Boudron, 1982**).

Une colonie bactérienne a été déposée sur une lame stérile contenant une goutte d'eau distillée. Après homogénéisation quelques gouttes de H_2O_2 ont été déposées sur le frottis. La souche est dite catalase positif s'il y'a une effervescence.

- **ONPG**

Pour dégrader le lactose ; les microorganismes doivent posséder deux enzymes : la perméase et β -galactosidase, l'épreuve ONPG permet de mettre en évidence la β - galactosidase qui dégrade l'ONPG qui présente une structure analogue au lactose

L'hydrolyse de l'ONPG libère l'orthonitrophényl qui est responsable de la coloration jaunâtre de milieu (**Marchal et Boudron, 1982**).

On dépose une colonie bactérienne dans un tube stérile contenant 1 ml d'eau distillée stérile puis on ajoute un disque d'ONPG.

Si la couleur vire au jaune, la souche est dite de test positif et si elle reste blanche, le test est négatif.

- **TSI**

Ce test permet de mettre en évidence d'une part, la fermentation du glucose, lactose et saccharose et d'autre part la production des sulfure d'hydrogène H₂S. Le glucose, présent dans le culot, est attaqué par voie fermentative entraînant une acidification du milieu avec production ou non de gaz sur la pente, le lactose et le saccharose seront oxydés et fermentés. La production du H₂S se manifeste par noircissement du culot (**Marchal et Bourdon 1982**).

Une colonie bactérienne a été ensemencée en réalisant une piqure centrale dans le culot et des stries serrés sur la pente. La Fermentation de lactose et saccharose se traduit par une pente jaune : lactose, saccharose positif (Pente rouge : lactose, saccharose négatif). La Fermentation de glucose se traduit par un culot jaune : glucose positif (culot rouge : glucose négatif). La production de gaz se manifeste par la présence des bulles de gaz dans le culot. La souche est dite H₂S positif, si un noircissement au milieu de la zone joignant la pente et le culot se manifeste.

- **Mannitol mobilité**

Le mannitol est un polyalcool issu de la réduction de D-fructose, sa dégradation conduit à la formation de fructose qui est attaqué en donnant des acides à chaîne courte (**Marchal et Bourdon1982**).

Une colonie bactérienne a été inoculée dans la gélose en réalisant une piqure centrale.

- ✓ Si on observe des stries au tour de strie ensemencé on dit que cette bactérie est mobile
- ✓ Le virage de la couleur de milieu de rouge au jaune, la souche est mannitol positif.

- **Citrate de Simmons**

La gélose citrate de Simmons contenant du citrate de Simmons et du sel d'ammonium ainsi que du bleu de bromothynol est utilisé pour ce test, les colonies qui fermentent le citrate (grâce à la présence de l'enzyme citrates) lancent la réaction entre ces ions, ils apparaissent sous forme des colonies blues ou ayant un centre bleu. Les colonies incapables de fermenter le citrate de Simmons restent blanches (**Guiraud, 2003**).

Les isolats ont été ensemencés en stries sur la pente de la gélose inclinée. La souche est dite citrate positif si la couleur du milieu change en bleu et citrate négatif si elle reste verte.

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

Ce milieu permet de rechercher les voies fermentaires des bactéries et de différencier entre les différents types de fermentation. Il est d'une grande importance pour l'identification des bactéries de la famille des Enterobacteriaceae (bacille gram -, oxydase -) et d'autres bacilles Gram négatif (Dellarras, 2007 ; Joffin et Leyrol, 2006).

Une suspension bactérienne dense a été ensemencée sur le bouillon Clark et Lubs. L'acidification de milieu, liée à l'utilisation du glucose, entraîne le virage de sa couleur au jaune.

Après incubation, deux réactifs ont été ajoutés

- ✓ **Rouge de méthyle (test RM)** : C'est un réactif utilisée pour mettre en évidence la voie fermentative des acides mixtes lors de l'identification des entérobactéries. La fermentation du glucose produit de l'acide pyruvique, puis des acides organiques. Ces acides font virer le RM au rouge.
- ✓ **Voges-Proskauer (test VP)**: C'est un réactif utilisé pour mettre en évidence la voie fermentaire du butane – 2, 3–diol lors de l'identification biochimique des entérobactéries, cette réaction permet de mettre en évidence l'acétoïne ou (3 – hydroxybutanone), parce que Le butane – 2, 3 – diol ne peut pas être mis en évidence facilement.
- **L'ornithine décarboxylase (ODC)** : est une enzyme qui libère le groupement carboxyle de l'acide aminé ornithine et donne production de la putrescine qui alcalinise le milieu. **Dellarras (2007) ; Joffin et Leyrol (2006).**
- **La lysine décarboxylase (LDC)** :est une enzyme qui libère le groupement carboxyle de l'acide aminé lysine et donne production de la cadavérise qui alcalinise le milieu. **Dellarras (2007) ; Joffin et Leyrol (2006).**
- **L'arginine d'hydrolase (ADH)** :est une enzyme qui dégrade l'arginine en libérant de l'ammoniac et des amines qui alcalinisent le milieu. **Dellarras (2007) ; Joffin et Leyrol (2006).**

II.5.7. Conservation des souches bactériennes

➤ Conservation de courte durée

Cette conservation des souches pures est effectuée sur milieu solide MRS ou M17 inclinée. Après croissance à température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches doit se faire par repiquage toutes les quatre semaines (**Badis et al., 2005**).

➤ Conservation de longue durée

Les isolats sont retenus à -20°C dans une solution contenant 70% de lait écrémé (enrichie par 0,5 g/l de glucose et 0,5 g/l d'extrait de levure) et 30% de glycérol à 40% (**Samelis et al., 1994 ; Bolduc et al., 2006**).

II.5.8. Etude de certaines activités fonctionnelles des isolats lactiques

II.5.8.1. Capacité d'auto-agrégation

L'auto-agrégation des souches bactérienne est une étape nécessaire pour la formation de biofilm et l'attachement aux différentes surfaces.

L'étude de l'auto agrégation des isolats a été réalisé en adoptant le protocole de **Kos et al (2003)** ; il consiste à faire décanté, dans PBS, des bactéries chacune à part. Les bactéries ont été cultivées dans le MRS ou M17 liquide et incubé à 37°C pendant 18h ; Les cellules bactériennes ont été récupérées par centrifugation 5000g / 15 mn avant d'être décantées, ces bactéries ont été lavées trois fois puis l'inoculum utilisé a été ajusté à 0.08 sur l'échelle 0.5 MacFarland (**Andrew, 2008**). La DO a été lue à 625 nm, chaque heure lors d'une décantation de 3 à 4 h à la température de laboratoire.

II.5.8.2. Capacité de formation de biofilm

L'étude de la capacité de formation de biofilm a été effectuée en adoptant le protocole modifié de **Boubakeur et al. (2016)**. Des cultures jeunes, préalablement préparées, ont été utilisé pour étudier la propension des isolats lactiques à s'organiser en biofilm. Des inocula de 10^7 germes/ml ont été ajustés et des volumes de 100 µl de chaque inoculum ont été déposés dans des puis d'une

microplaque de 90 puits. La microplaque a été incubée pendant une nuit à 37°C pour permettre aux germes de s'adhérer aux puits. Après incubation, une coloration au cristal violet (0.1%) a été faite. Des photos ont été prises pour l'estimation qualitative de biofilm formé.

Pour la quantification de biofilm formé par les différents isolats, le même protocole a été adopté en utilisant des tubes à essai. Après incubation, coloration au cristal violet et prise de photos, les cellules adhérentes ont été détachées par l'acide acétique (30%). La formation du biofilm est considérée comme positive lorsqu'un film visible recouvre le mur et le bas du tube ou du puits. Pour la quantification, les densités optiques ont été prises à 625 nm afin d'estimer le nombre de germes adhérents en utilisant la corrélation de **Lambin et Germa (1965)**.

II.5.8.3. Activité protéolytique

L'activité protéolytique des isolats a été recherchée dans une gélose enrichie par le lait écrémé stérile à raison de 2 % et 10% selon la méthode adaptée par **Roudj et al. (2009)**.

Après incubation à 37/44 °C pendant 24-48h, l'apparition des colonies sur gélose est un indicateur de l'activité protéolytique de ces isolats (**Hassaine , 2013**).

*RESULTATS ET
DISCUSSIONS*

III. 1. Fractionnement de l'échantillon

La préparation de l'échantillon et le prélèvement de la portion destinée à l'analyse sont deux étapes essentielles dont dépend l'exactitude du résultat

L'échantillon représentatif fractionné par la méthode de cône rapporté dans la (photo 02).

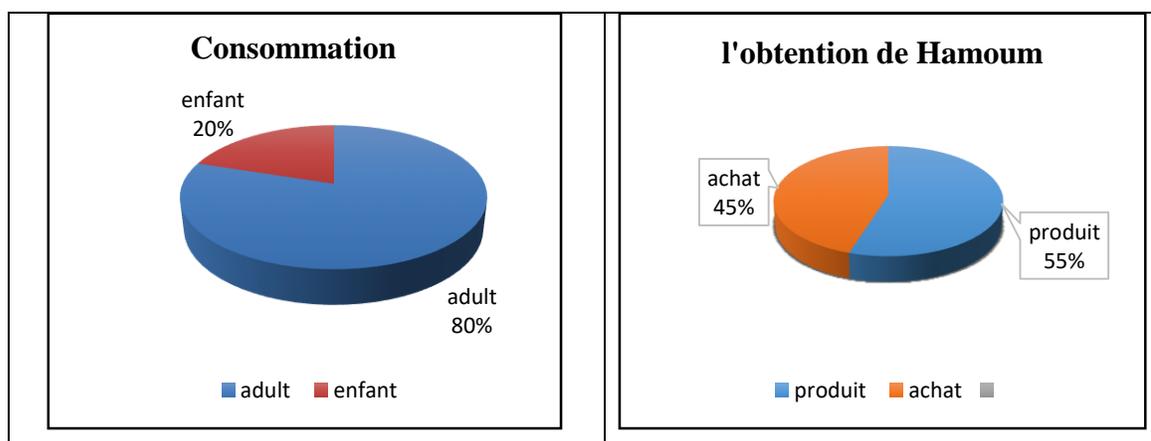


Photo N°02 : Echantillon séparé en quatre et deux parties égales par la méthode de cône .

Deux quarts opposés sont réunis et mélangés pour former un sous échantillon représentatif destiné aux différentes étapes d'analyse.

III.2. L'établissement de questionnaire

Le questionnaire qui a été établi se fait sur une population de 20 personnes (hommes et femmes âgées qui ont de plus de 40 ans) (figure N°04).



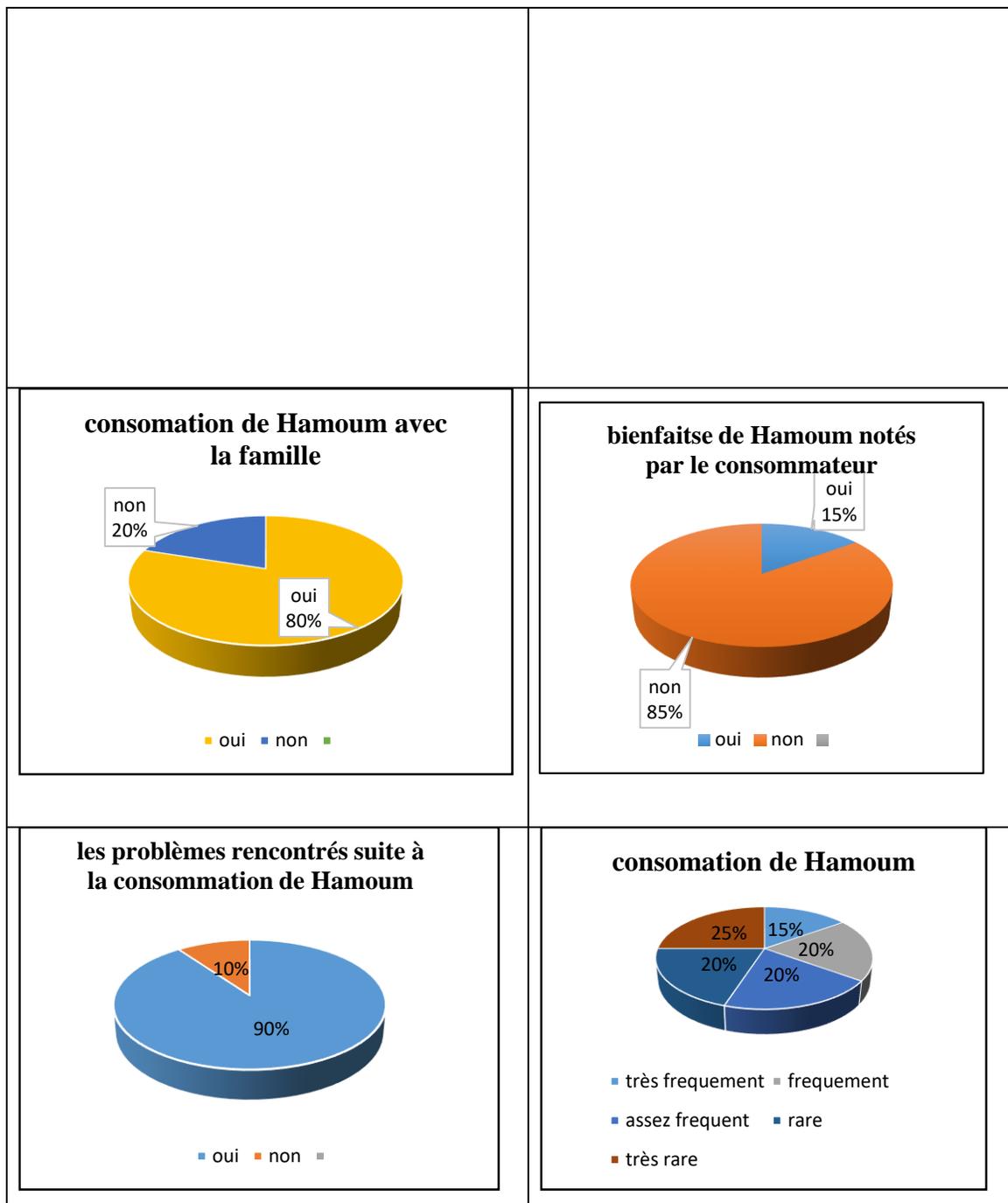


Figure N° 04 : Secteurs statistiques représentent les fréquences de consommation de hamoum selon différents critères...)

Il a été noté une fréquence faible de la consommation de Hamoum dont 80% de consommateurs sont des adultes contre 20% de consommateurs enfants. La consommation est essentiellement en famille (80%). Ce produit de grand intérêt sanitaire est en train de perdre de l’appréciation dans la

nouvelle génération, face aux produits alimentaires industriels qui remplissent les marchés. 75% de la population productrice ne connaissent pas les bienfaits santé de ce produit qui abrite un microbiote de grande importance pharmaceutique (probiotiques) et de substances bioactives (prébiotiques). 90% des interrogés ont signalé des problèmes de digestion suite à l'ingestion de Hamoum sous forme de couscous, conséquences de la richesse de ce produit fermenté en microbiote diversifié, fibres et métabolites microbiens divers.

Les détenteurs de Matmor sont les principaux consommateurs de Hamoum (55% répondants) contre 45% répondants l'achètent.

La qualité organoleptique (aspect, odeur, saveur) et nutritionnelles fonctionnelles (composition biochimique et microbiologique bénéfique à la santé) du blé sont fortement améliorées par fermentation des nouvelles organoleptiques (**Mokhtari, 2016 ; Merabti, 2015**). Il serait important de recommander ce produit local d'une grande valeur nutritionnelle à fin de prévenir les maladies nutritionnelles et les pathologies infectieuses gastriques qui deviennent fréquentes dans les sociétés

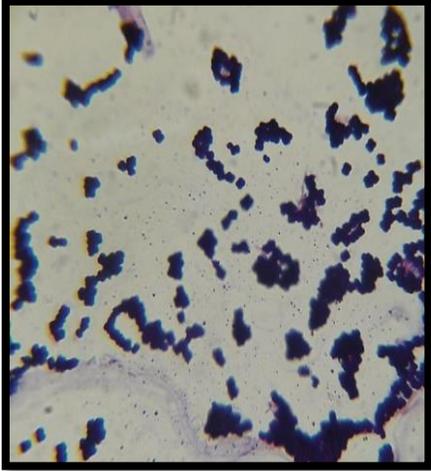
III. 3. Analyse microbiologique

Les aliments fermentés à base de céréales abritent divers microorganismes, en association ou non, qui comprennent les LAB, les levures et les champignons filamenteux (**Guyot, 2010**). Notre échantillon s'est révélé riche en microbiote diversifié. Les résultats de l'analyse microbiologique sont consignés dans les **tableaux 5 et 6**.

La flore pathogène a été isolée sur : Chapman, Macconkey, VF. PCA et Colombia sont des milieux sélectifs pour la flore totale. Pour la flore lactique L'emploi d'un seul milieu standardisé, risque d'être peu significatif. De ce fait, nous avons utilisé trois milieux de cultures différents (MRS, MRS acide et M17). Cinq colonies, symbolisées par **BFT₁, BFT₂, BFT₃, BFT₄, BFT₅**, de morphologies et caractéristiques phénotypiques différentes ont été détectées sur les deux milieux MRS et M17. Aucun isolat n'a été obtenu sur MRS acide (tableau5).

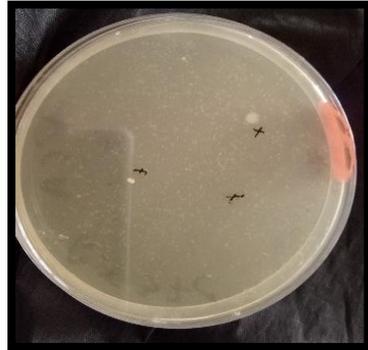
RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau N°05 : Caractères cultureux et microscopiques de la flore totale.

La dilution 10^{-3}	La boîte	dénombrement	La coloration de gram
<p>Chapman : Une seule colonie a été obtenue d'un inoculum d'une dilution de 10^{-3}</p> <p>Le développement n'a pas été accompagné par le virage de la couleur. La coloration de Gram révèle l'aspect de Staphylocoque : coque à Gram positif</p>		<p>Une charge bactérienne de 10^3UFC/ml.</p>	

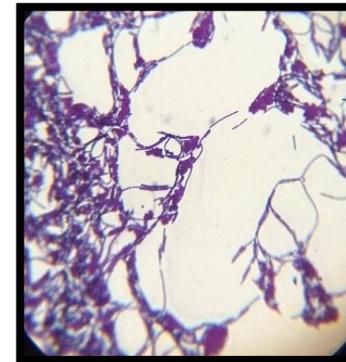
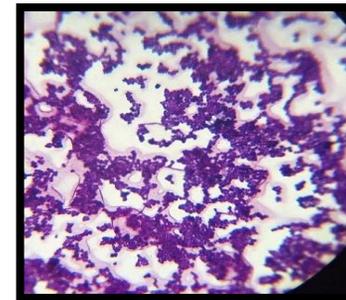
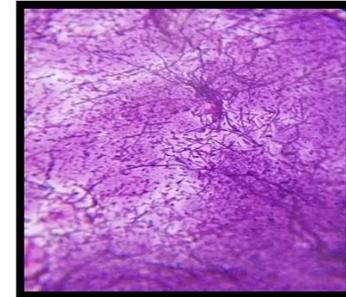
Flore diversifiée sur PCA :

trois types de colonies ont été distinguées de taille et viscosité différentes. La coloration de Gram révèle la présence d'un mélange de coques, coccobacilles et de grands bacilles, à Gram positif et négatif.

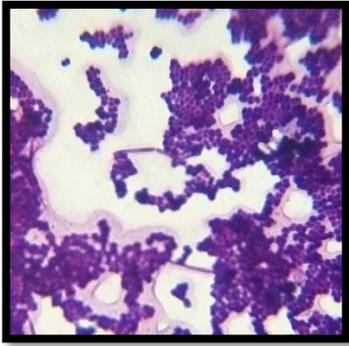
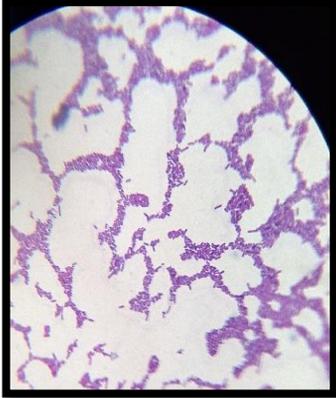


3×10^3 UFC/ml

3 colonies ont été détectées. Une grande colonie(1) , moyenne (2) Petite colonie (3)de couleur blanchâtre de différents taille



RESULTATS ET DISCUSSION

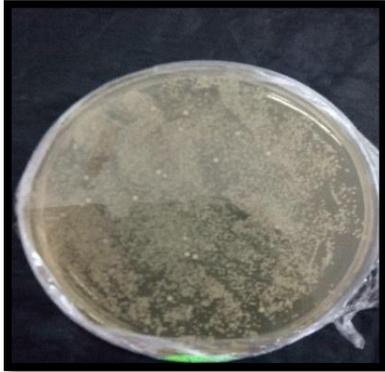
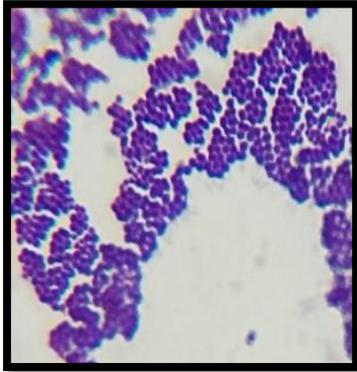
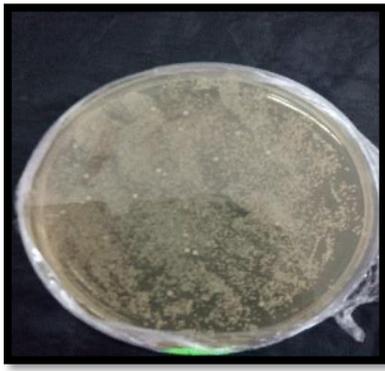
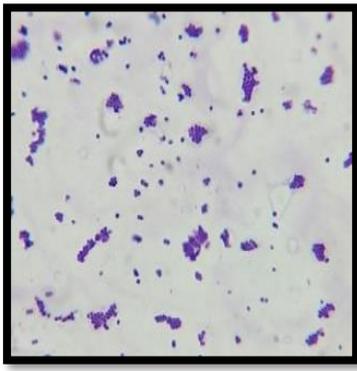
<p>Flore totale bactérienne sur Columbia</p> <p>Des colonies nombreuses ont été obtenues sur cette gélose. Un mélange de coques et bacilles à Gram+ s'est révélé par la coloration de Gram.</p>			
<p>Macconkey : Une seule colonie a été révélée. La coloration de Gram permet d'identifier des cocobacilles de petite taille à Gram-, milieu sélectif pour Enterobacteriaceae</p>		<p>Une charge bactérienne de 10^3UFC/ml</p>	
<p>VF la gélose n'a été pas fragmenté ce qui indique l'absence de Clostridium</p>			

Les familles bactériennes identifiées sont : *Enterobactériaceae*, *Staphylococcaceae*, résultats concordent avec ceux trouvés dans plusieurs études (**Bartali *et al.*, 1990 ; Cahagnier, 1996 ; Heikkila et Saris, 2003 ; Bayrock et Ingledew, 2004 Leyral et Vierling, 2007 ; Yateem et al., 2008 ; Yao et al, 2009; Mokhtari, 2012 ; Kezimana et Koman, 2013**).

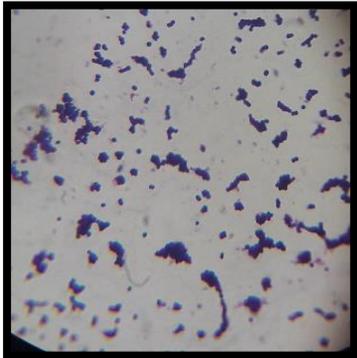
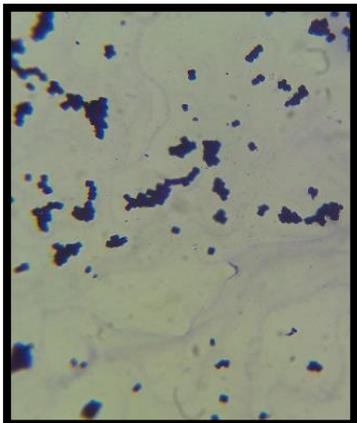
La présence de cette flore pathogène a été dominée par la présence d'une flore lactique importance ; les genres identifiés sont : *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Lactococcus* (**Tableaus 5, 6 et 7**).

RESULTATS ET DISCUSSION

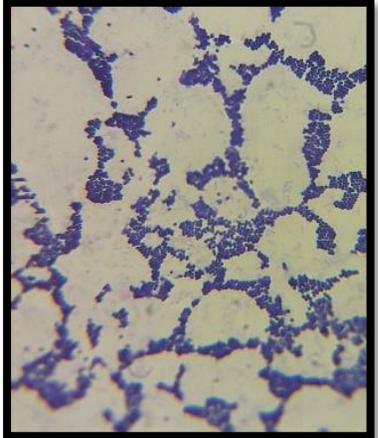
Tableau N°6 : Caractères cultureux et microscopiques des bactéries lactiques.

Isolat	Conditions de culture	Aspect sur boîte et coloration de Gram		Description
BFT ₁	MRS (10 ⁻⁶)/ 30°C			Grande colonies de couleur blanchâtre et rondes. coques régulier en amas à Gram positif
BFT ₂				petite colonies de couleur crèmeuse et rondes. coques de petites taille en amas et à Gram positif

RESULTATS ET DISCUSSION

BFT ₃	MRS (10 ⁻³) à 44°C			Colonies crémeuses visqueuses rondes. Coques en amas à Gram positif
BFT ₄	M17 (10 ⁻⁴) à 30°C			Colonies crémeuses rondes. Coque en amas à Gram positif

RESULTATS ET DISCUSSION

<p>BFT₅</p>	<p>M17 (10⁻⁶) a 44°C</p>			<p>colonies crèmes rondes. Coques en amas à Gram positif</p>
------------------------	---	--	---	--

La diversité et la prédominance des genres des bactéries lactiques isolées à partir des produits fermentés dépend relativement et principalement de la nature du matériel biologique d'isolement et de différentes méthodes utilisées (Ftzsulmons et al., 1999 ; Bissomette et al., 2000). La composition microbienne prédominante en coques lactiques de notre échantillon est en accord avec plusieurs travaux précédents. Cette dominance a été décrite par plusieurs auteurs (Haroun-Ur-Rashid et al., 2007 ; Sengin et al., 2009 ; Ennadir et al., 2014 ; Mokhtari, 2015).

Hardy (1982) ; Bervas (1991) ; Infantes et Tourneur (1991) ; Louembé et al., (2003) ; Ennadir et al. (2014) ont montré que les espèces du genre *pediococcus* sont fréquemment isolées de plusieurs produits végétaux (céréales, choucroutes, concombres, olives et fruits). Comparativement à l'étude de Corsetti et al., (2007), les entérocoques ont été les plus isolés des échantillons de blé et sont principalement représentés par les espèces *Entérocoques faecium* et *Enterococcus mundtii*.

Devriese et al., (1992) ont montré que les entérocoques sont des contaminants naturels de différentes surfaces organiques. Ils sont présents sur les parties aériennes des végétaux (céréales et plantes fourragères) et participent à la fermentation des aliments (Franz et al., 1999). Nous signalons à ce propos que dans la littérature ce genre est le plus controversé des bactéries lactiques ; certains auteurs le considèrent comme agent d'altération tandis que d'autres l'admettent comme un élément contribuant positivement à la maturation et au développement de la saveur des produits. Par ailleurs, la présence de l'espèce *Lactococcus lactis* est similaire à ce qui a été signalé par Corsetti et al., (2001) lors d'une étude sur les farines de blé italien. L'espèce *Lactococcus lactis* est en effet des espèces communément isolées à des fréquences variables de différents produits fermentés, des levains, des produits laitiers et des produits végétaux.

Une présence probable d'une espèce hétérofermentaire de *Weissella* a été noté dans cette étude, une présence à confirmer par d'autres tests d'identification biochimique, ce résultat est similaire avec celui trouvé par Elkolei et Ayadi (2017) qu'ils ont constaté la présence du genre *Weissella* en faible pourcentage 2.5% dans leur étude d'isolement des bactéries lactiques à partir de blé dur et tendre. Ben Mehel et al., (2016) ont aussi rapporté la présence faible de *Weissella*.

La présence d'une flore qui pourrait être toxigénique et pathogène, notamment *Staphylococcus* spp, *E. coli*, *Enterococcus* spp, et *Weissella* nécessite la mise en évidence du risque sanitaire (et

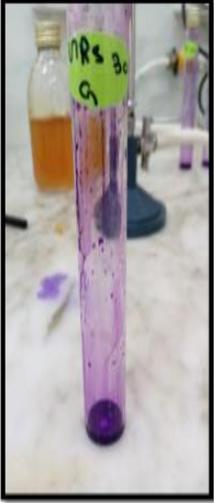
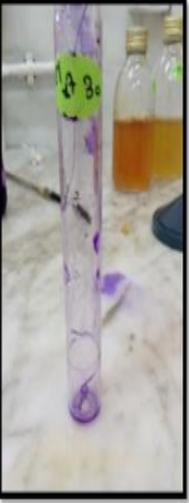
le report d'indisposition digestive) de ces germes afin de connaître les points de contamination et mesurer les risques associés. Il reste à noter qu'une confirmation de ces attributs est fortement recommandée par des tests d'identification biochimiques (galerie API) et moléculaires.

III.4. La formation de biofilm et capacité d'agrégation

Les cinq isolats lactiques présumptifs ont été identifiés par rapport à leur propension à s'organiser en biofilm et capacité d'agrégation (tableaux 7 et figure 7).

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau N°07: Biofilm des 5 isolats lactiques

BFT ₁	BFT ₂	BFT ₃	BFT ₄	BFT ₅
Methode en tube				
				

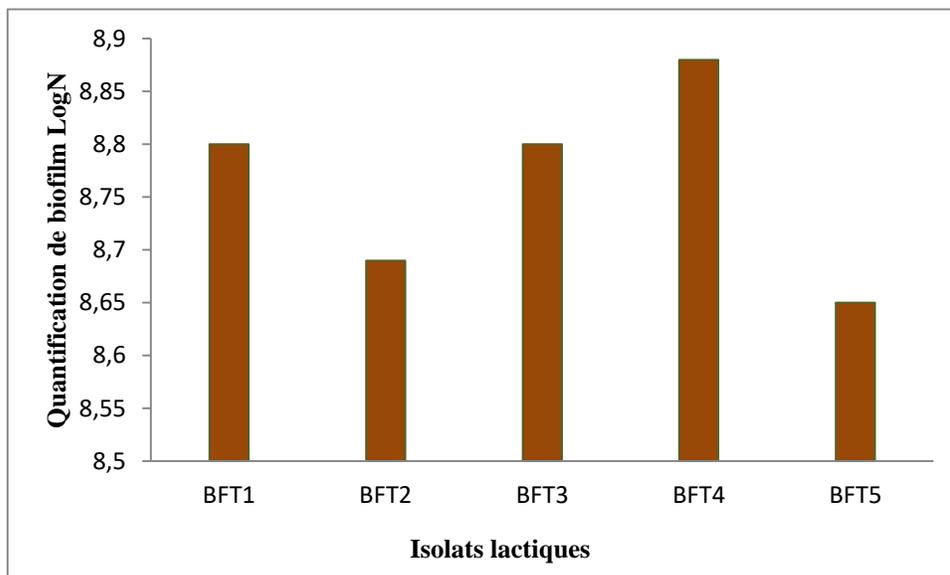


Figure N°05 : Quantification de biofilm des 5 isolats.

Une capacité notable de formation de biofilm a été enregistrée pour les différents isolats. Un biofilm convoité a été noté pour BFT4 (identification présomptive : *Enterococcus faecalis*).

III.5. Capacité d'agrégation

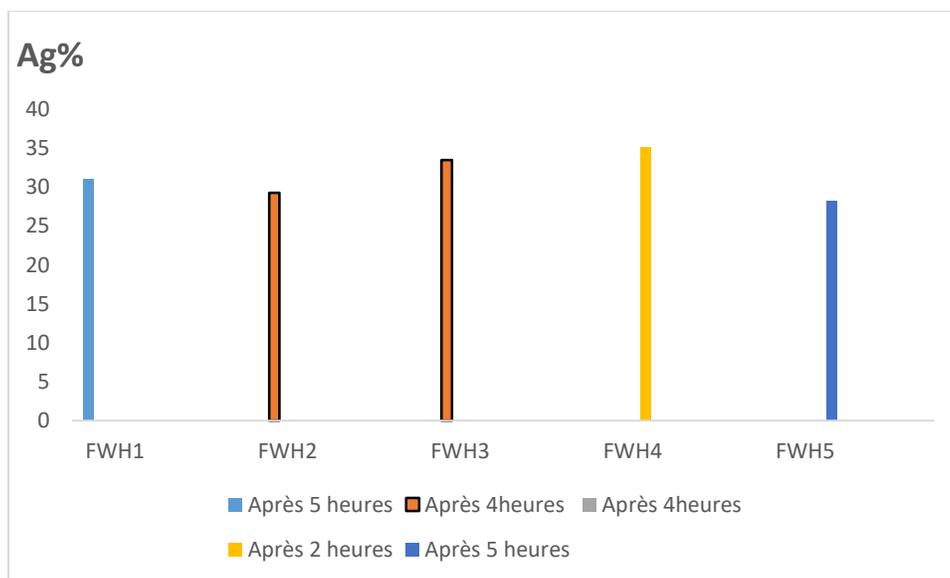


Figure N° 06: Capacité d'agrégation des isolats

Une augmentation de la capacité d'agrégation des cinq souches isolées durant la décantation a été noté ce qui montre une forte interaction entre les isolats et la surface d'implantation.

Pour des considérations technologiques, la capacité de production de biofilm et le profil de production d'enzymes sont des caractéristiques importantes dans la sélection et l'évaluation de potentielles cultures starters (**Berlanga et Guerrero, 2016 ; Latorre et al., 2016**).

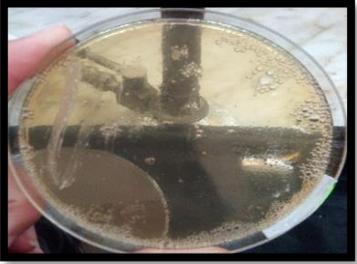
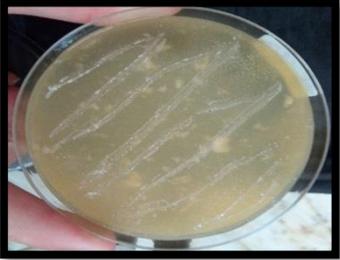
La capacité de production du biofilm est révélée par une forte aptitude à s'adhérer au polystyrène. **O'Toole et Kolter (1998) et Boubakeur et al., (2016 ; 2018)** ont aussi noté une forte propension des bactéries lactiques à s'organiser en biofilm et une capacité d'agrégation significative.

Gutiérrez-Correa et al., (2012) ; Mokhtari. (2012) ; Merabeti et al., (2014) ; Berlanga et Guerrero (2016) ; Wolfe et Dutton, (2016) ont montré que le procédé de fermentation de substrat solide (cas de blé) offre des conditions de stress (température, activité de l'eau, oxygénation) permettant ainsi la sélection et la dominance de bactéries d'une grande capacité de formation de biofilm. Le biofilm a des propriétés uniques et un avantage considérable pour la formulation des starters et la bioconversion de la matrice par une architecture avantageuse et une expression différentielle des gènes unique **Berlanga et Guerrero, (2016) ; Gutiérrez-Correa et al., (2012)**.

III. 6. Activité protéolytique

Les résultats montrent que les cinq isolats lactiques ont poussé sur la gélose enrichie par différentes concentrations du lait écrémé (0.2% et 10%) (tableau9).

Tableau N° 8 : Activité protéolytique des 5 isolats lactiques.

Isolat	2% de lait écrémé	10% de lait écrémé
BFT1		
BFT2		

RESULTATS ET DISCUSSION

BFT3		
BFT4		
BFT5		

Kermiche (2013) ont révélé une activité protéolytique performante chez 27 isolats lactiques. **Merabti (2015)** ont montré que la dégradation des protéines par les LAB est initiée par les protéases membranaires et/ou endogènes, qui les hydrolysent en oligopeptides. Ils sont ensuite absorbés par l'intermédiaire de systèmes de transport spécifiques et subissent une dégradation supplémentaire en peptides plus courts et en acides aminés par l'action concertée de diverses peptidases intracellulaires **Endo and Dicks, (2014)** ; **Elkolei et Ayadi (2017)** ont constaté que toutes les souches étudiées présentent une croissance avec une activité protéolytique traduite par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie.

CONCLUSION

Conclusion

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes dominants retrouvées au cours de la fermentation de la majeure partie des aliments notamment les produits à base de céréales et particulièrement le blé dur fermenté. La diversité et la prédominance des genres des bactéries lactiques isolées à partir des produits fermentés dépend relativement et principalement de la nature du matériel biologique d'isolement et de différentes méthodes utilisées pour l'étude.

Notre travail a pour objectif d'analyse microbiologique, l'isolement et l'identification de certaines bactéries lactiques impliquée dans la fermentation de blé dur « HAMOUM » de la région Freneda –Tiaret. Les résultats révèlent un microbiote diversifié avec une dominance notable des LAB.

Des taux importants d'auto-agrégation et un biofilm convoité ont été enregistrés lors de cette étude. L'agrégation et la formation de biofilm sont dépendantes des structures de surface des cellules où l'incorporation des prébiotiques dans le milieu peut améliorer ou altérer la physiologie métabolique du germe. Il est intéressant d'étudier le mécanisme moléculaire d'interaction surface d'attachement et les propriétés physicochimiques de la paroi cellulaire et de déterminer la consistance et la structure chimique de biofilm sous microscope électronique à fin de comprendre l'impact des biomolécules végétales constituant le blé fermenté sur la propension des bactéries à s'organiser en biofilm.

Une activité protéolytique importante chez les isolats de bactéries lactiques a été notée. Des techniques plus avancées permettant l'isolement et la purification des protéases des différents isolats est recommandée.

A

Aubert, C (1985). Les aliments fermentés traditionnels. Ed. Terre Vivante, Paris, 252 p.

Adams MR, Moss MO(1995). Food Microbiology. 1st ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry;. 398 p.

Axelsson. L (2004).Lactic acid bacteria: classification and physiology In: Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects (eds: Salminen S. V on wright A.and Ouswehard AC) Third edition Marcel Dekker Inc New York.Pp:1-66.

Ashcroft, A. E (2016). The Astbury Centre for Structural Molecular Biology [Page Web]. Accès : <http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm> (page consultée le 30 mars 2016).

Andrew, J.M (2008). BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 7). Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 62: 256-27

B

Back, W (1994). Farbatlas und Handbuch der Getrãnkebiologie. Teil 1: Kultivierung/Methoden Brauerei, Winzerei. Nũrnberg: Hans Carl Getrãnkefachverlag.

Banigo, E. O. I (1993). Nigerian ogi. In K. H. Steinkraus (Ed.), Handbook of indigenous fermented foods (pp. 212–222). New York: Marcel Dekker.

Bartali, H., Debbarh, A (1991). Evaluation et amélioration de la technique traditionnelle du stockage souterrain des céréales au Maroc, Hommes, Terre et Eaux, Marocaine des Sciences et Techniques du Développement Rural, 82

Burin Des Roziers. M. P. C. M (2002) : Les biofilms. Thèse doctorat vétérinaire

Parot. S, (2007) : Biofilms électroactifs Formation, Caractérisation et mécanismes : Thèse de docteur. De L'institut National Polytechnique de Toulouse.

Bel kaaloul K, Chekroun A. Ait Abdessalam A, Saidi D, Khekrua O(2010).Growth, acidification and prokolyis performance of two-co-culture (lactobacillus plant arum Bifidobacterium longer and Streptococcus thermophilus-Bbifidobacterium longum). Afr J Biotechnol, 9, (10): 2463-1467

Badis A. Laouabdia-Sellami N, Guetarni D, Kihal M .et Ouzrout.R(2005).Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de 2 populations caprines locales « Arabia et kabyle ». Science &technologie N°23.Pp :30-37.

Bolduc MP, Raymond Y, Fustier P, Chalpogne, and Vuilleumrd JC (2006). Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk, *Int. Dairy J.* 16:1038-1038.

Bartali, H., Dunkel, F.V., Said A., Sterling, R.L (1990). Performance of plastic lining for storage of barley in traditional underground structures (Matmora) in Morocco. *J. Agric. Engng Res.*, 47, 297-314.

Bervas E., PhD (1991). Thesis, Université de Clermont-Ferrand II, France, (1991).

Bayrock, P.D., Ingledew, M.W (2004). Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* 13,62–368

Berlanga M., Guerrero R (2016). Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb Cell Fact*, 15 :165. 1-11p.

Belbel Z (2013). Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées dans les hôpitaux de la ville d'Annaba . Thèse de Doctorat. University Badji Mokhtar Annaba . 38 P.

Bissonnette F. Labine S. Deveau H. Lamoureux M. and Moineau S. (2000). Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged cheddar cheese *J. Dairy Sci.* 83,620-627.

Boubakeur, B., Tirtouil, A., Khadem, H., Meddah, B., Ahcen, S. (2016). An Assessment of the Effect of Aqueous Extract from *Thymus fontanesii* on Growth, Aggregation and Biofilm Formation of Pathogenic and Probiotic bacteria. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 6(7)1-1.

Boubakeur, B., Drabo, M.S., Khadem, H., Mullier, C., Tirtouil, A. (2018). Influence of the exopolysaccharides of polyphenols-conditioned lactic acid bacteria on gut microecology and bacterial translocation (data accepted in Ukrainian journal of ecology-18-1).

C

Chavan, J. K., & Kadam, S. S. (1989). Critical reviews in food science and nutrition. *Food Science*, 28, 348–400.

Caplice, E., & Fitzgerald, G. F (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131–149.

Charlier C, Cretenet M, Even S, Le Loir, Y(2009). Interactions between *Staphylococcus aureus*

and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*.; 131:30–39. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06032

Collado, C. M (2009). Role of probiotic in health and diseases. In: *Handbook of probiotic and prebiotic* (2nd ed. Y.K Lee and S. Salminen) p. 608, pp. 257-350. John Wiley et Sons

Chedid M (2007).Qualité physicochimique et microbiologique de produits laitiers caprins traditionnel libanais, Mmoire de fin d'étude Université libanaie, Faculté d'Agronomie.

Carver Brett F (2009). *Wheat: Science and Trade*. Wiley-Blackwell; 616P.

Cauvain Stanley P (2003). *Bread making: improving quality*. Woodhead Publishing in Food.

Cahagnier B (1996). Céréales et produit dérivé In « microbiologie alimentaire » tome 1 «

aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments ». Edition Technique et

Documentation Lavoisier., Paris : 392-414.

Corsetti A., Lavermicocca P., Morea M., Baruzzi F., Tosti N., Gobbetti M., Int. J (2001). *Food. Microbiol.* 64 95.

Corsetti A., Settannia L., Chaves Lo' peza C., Giovanna E.F (2007), Mastrangelo M., Giovanna S., Sys. Appl. Microbiol. 30 561.

Collado, C. M (2009). Role of probiotic in health and diseases. In: *Handbook of probiotic and prebiotic* (2nd ed. Y.K Lee and S. Salminen) p. 608, pp. 257-350. John Wiley et Sons.

D

Djermoun, A(2009). La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. *Nature et Technologie*, 01

Druvefors, U.Å (2004). Yeast Biocontrol of Grain Spoilage Moulds Mode of Action of *Pichia anomala*. Thèse de doctorat. Université des Sciences Agronomiques, Uppsala, Suède. 466 p

Dellarras C (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Technique et documentation. France. Lavoisier. 462 p.

E

Escalante, A., Wachter, C., & Farres, A (2001). Lactic acid bacteria diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 21–31.

El azzaoui S (2011). Contribution à l'étude de l'effet anti-biofilm des huiles essentielles : *Mentha pulegium* et *Laurus nobilis*. Mémoire de master. Sciences et Techniques, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. p10.

Ennadir J. Hassikou R. Al Askari G., Arahou M., Bouazza F., Amallah1 L., Amine S.A. & Khedid K (2014): Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées des farines de blé d'origine marocaine (Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat flour from Morocco). *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (4): 1125-1132

ENDO, A. and L.M.T. DICKS (2014). Physiology of the LAB. In *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*.

Elkolei B.Ayadi A (2017). L'isolement et caractérisation des bactéries lactiques à partir du blé dur et blé tendre en Algérie. Mémoire de Master.

F

Fleet, G. H. (1998). The microbiology of alcoholic beverages. In J. B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods* (pp. 217–262). London: Blackie Academic and Professional.

Franz C.M.A.P., Holzappel W.H., Stiles M.E., In. J (1999). *Food Microbial.* 47 1 – 24

Fitzsimmons NA. Cogan TM, Condon.S.and Beresford T (1999). Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic bacteria in mature cheddar cheese-*Appl Environ Microbiol*, 65: 3 418-3426.

Felis, G. E., Salvetti, E et Torriani,S (2016). Systematics of Lactic Acid Bacteria: Current Status. In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* (2ndeds F. Mozzi, R. R. Raya, and G. M. Vignolo), p. 395, pp. 25-31.

G

Garami M. Schuler D. Babosa M. Borgulya G. Hauser P. Muller J. Paksy A.

Szabo E. Hidvigi M. Fekete Gy (2004). Fermented wheat germ extract reduces chemotherapy-induced febrile neutropenia in pediatric cancer patients. *J-Pediatric Hematol Oncol*;10:631-635.

Guiraud, J.P (2003). Microbiologie alimentaire. Edition Dunod. Paris. 8-101

GUYOT, J.P (2010). Fermented Cereal Products. In *Fermented foods and beverages of the world* p. 448. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, USA

Guiraud J-P (1998) : Microbiologie Alimentaire. Ed: Dunod, Paris, pp: 136-144

Gutiérrez-Correa M, Ludeña Y., Ramage G., Villena G. K (2012). Recent Advances on Filamentous Fungal Biofilms for Industrial Uses. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 22p

Gourgaud M .et L Larpent J .P (1997) : Mémento technique de microbiologie ,3ème édition Tec et Doc Paris PP 114-135- 158.

H

Hammes, W. P., et Ganzle, M. G (1998). Sourdough breads and related products. In B. J. B. Wood, 2nd ed. *Microbiology of fermented foods* (Vol. 1) (pp. 199–216). London: Blackie Academic and Professional.

Halm, M., Lillie, A., Spreusen, A. K., & Jakobsen, M (1993). Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize doughs for kenkey production in Ghana. *International Journal of Food Microbiology*, 19, 135–143.

Hidvegi M. Moldvay J, Lapis.K, Ajkay Z (2003).. The fermented wheat germ containing product enhances quality of life for patients with lung cancer. *Pulmonology*,

Harris, L. J (1998). The microbiology of vegetable fermentations. In B. J. B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods*, Vol. 1 (pp. 45–72). London: Blackie Academic & Professional).

Hansen, E. B(2002): Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78, , pp. 119-131

Hammes WP. Et Hertel C (2006). The Genera Lactobacillus and Carnobacterium. The Prokaryotes, 4 :320-403.

Hardy J.L (1982). PhD Thesis, Université Technologique de Compiègne, France,

Heikkila.MP.Saris PEJ (2003). inhibition of Staphylococcus aureus by the commensal bacteria of human milk Applied Microbiol 95:471-8.

Harun-ur-Rashid.M.K.Togo.M.Ueda and T.Miyamoto (2007).Identification and characterization of domination lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk Dahi in Bangladesh.World J.Microbial.Biotechnol., 23:125-133.

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

Holzappel, W.H. et Wood, B.J.B (1995). Lactic acid bacteria in contemporary perspective. In: The Genera of Lactic Acid Bacteria (edsB.J.B. Wood et W.H. Holzappel) p-413, pp. 1-7. Chapman et Hali.

I

Iwasaki, K., Nakajima, M., Sasahara, H., & Watanabe, A (1991).

Rapid ethanol fermentation for soy sauce production by immobilised yeasts cells. Agricultural and Biological Chemistry, 55, 2201– 2207.

Infantes M., Tourneur C., Sci. Aliments. 11) 527–545.

J

Jespersen, L., Halm, M., Kpodo, K., & Jacobson, M (1994). Significance of yeasts and moulds occurring in maize dough fermentation for kenkey production. International Journal of Food Microbiology, 24, 239–248.

Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck. P., Brulé. G., Coord (2006). Sciences des aliments : Biochimie-Microbiologie-Procédés-Produits. Ed. Tec et Doc Lavoisier, Paris.453 p

Jakab F. Shoenfeld Y. BaloghA.Nichelatti M. Hoffman A. kahan Z. LapisK.MayerA. Sapy P. SzertpiteryF.TelekesA. ThurzoL.VagvolgyiA (2003). HidvegiM.Amedical nutriment has supportive value in the treatment of colorectal cancer. Br J Cancer,;89:465469.

Javanainen, P. - Linko, Y. Y (1993): Factors affecting rye sour dough fermentation with mixed culture pre-ferment of lactic and propionic acid bacteria. *Journal of Cereal Science*, 18, , pp. 171-185.

Joffin J.N., Leyrol G (2006). Microbiologie technique. Tome1. Dictionnaire des techniques. Bordeaux: CRDP d'aquitaine. 363 p.

K

Kim, H. Y. - Min, J. H. - Lee, J. H. - Ji, G. E (2000): Growth of lactic acid bacteria and bifidobacteria in natural media using vegetables, seaweeds, grains and potatoes. *Food Science and Biotechnology*, 9, , pp. 322-324.

Kalui Christine M., Mathara Julius M., Kutima Philip M (2010). Probiotic potential of spontaneously fermented cereal based foods. A review. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 99(17): 2490-2498.

Kos, B., J. Suskovic., S. Vukovic., M. Simprag., J. Frece and S. Matosic (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 981-987.

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

KezimanaF.Koman YB(2013). Caracterisation physicochimique, phytochimique et Microbiologique du blé dur fermenté (El Hamoum). Mémoire de Master. Université de Tiaret.

L

London, L.E.E; Ross, R.P; Fitzgerald, G.F. Fergus Shanahan Noel Caplice, M. Stanton, C (2016). Probiotics as cell factories for bioactive ingredients: focus on microbial polysaccharides and health beneficial effects. In: *Advances in Probiotic Technology* (ed, P. Foerst et C. Santivarangkna), Taylor et Francis Group, p. 380, pp. 77- 103.

Lambin, S., Germa, A. (1969) Précis de microbiologie tom 1. Librairie de l'académie de médecine 120, boul. saint-Germain. Paris: Masson & Cie, 669p.

Louembé D., Kéléké S., Kobawila S.C., Nzouzi J.P (2003) *Tropicultura*. 21 (1) 3-9

Leyrol Vierling E (2007) Microbiologie et toxicology des aliments : Hygiene et securté alimentaire 4^{ème} édition. Edition Doin.Paris.287.

M

McGee, H (1984). On food and cooking. New York: Charles Scribner's Sons/Macmillan Publishing Company p. 233.

Moss, M. O., Mpuchane, S. F., & Murphy, O. M (1993). Nigerian ogi. In K. H. Steinkraus (Ed.), Handbook of indigenous fermented foods (pp. 212–222). New York: Marcel Dekker.

McKay, L. L., & Baldwin, K. A (1990). Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 87, 3–14.

Mueller et al.,(2011). Promissing cytotoxic activity profile of fermented wheat germ extract (Aveamar) in human cancer. Journal of experimental & clinical cancer pesearch.30.42.

Mensah, P(1997): Fermentation - the key to food safety assurance in Africa? Food Control, 8, ,pp. 271-278.17.

Marchal, L., Bourdon, J.L (1982). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Edition Doin. Paris. 482 p

Merabti R (2014). Blé dur fermenté lemzeit : étude du nouveau procédé de fermentation à l'extérieur du matmora et caractérisation de l'écosystème (interactions du microbiote avec la matrice). *Université des Frères Mentouri-Constantine 1, thèse.*

Mokhtari S (2012). Effet protecteur de certaines bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté type *hamoum*. *Université El Séni (Oran, Algérie), Magistère.*

Mozzi, F., G. Savoy de Giori, G. Oliver, and G. Font de Valdez (1996). Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* in milk under different growth conditions. *Milchwissenschaft* 51:670–673.

.N

Nanson, N. J., & Field, M. L (1984). Influence of temperature on the nutritive value of lactic acid fermented cornmeal. *Journal of Food Science*, 49, 958–959.

Nche, P. F(1994). - Odamtten, G. T. - Nout, M. J. T. - Rombouts, F. M.: Dry milling and accelerated fermentation of maize for industrial production of kenkey a Ghanaian cereal food. *Journal of Cereal Science*, 20, , pp. 291-298

Novel, G. (1993). Les bactéries lactiques. In : *Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel* (ed J.Y Leveau et M. Bouix), p 591, pp. 170-331.. Tec et Doc. Lavoisier.

O

Onyekwere, O. O., Akinrele, I. A., & Koleoso, O. A. O (1993). In K. H. Steinkraus (Ed.), *Handbook of indigenous fermented foods* (pp. 212–222). New York: Marcel Dekker.

Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E(2002). Probiotics: an overview of beneficial elects *Journal of Microbiology.*; 82:279–289

Orla- Jensens, (1919) : The lactic acide bactéria mem. *Acid scie let PP* 81-96.

O'Toole, G, A, (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of visualized experiments.* (47), e2437, doi :10.3791/2437.

Osungbaro Taiwo O (2009). Physical and nutritive properties of fermented cereal foods. *African Journal of food Science ; Vol 3(2):* 023-027.

P

Pavlovic, M., et al (2013). “Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria.” *Open.Microbiol.J.* 7 : 135-41.

Prado FC, Parada JL, Pandey A, Soccol CR (2008). Trends in non – dairy probiotic beverages.

Food Research International.;41:111–123. DOI: 10.1016/j.foodres.2007.10.010

R

Roudj S, Belkheir K, Zadi-Karam H, Karam N.-E (2009). Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud-Ouest algérien. *Eur. J. Sci. Res.* 34(2):218-227.

S

Steinkraus, K. H (1998). Bio-enrichment: production of vitamins in fermented foods. In J. B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods* (pp. 603–619). London: Blackie Academic and Professional.

Sanni, A. I(1993): The need for process optimization of African fermented foods and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 18, , pp. 85-95.

Salleh A.B., Abdul Rahman R.N.Z.R., Basri M (2006). *New lipases and proteases*. Nova science Publishers. 159P

Serhan M.Cailliez-Grimal C.Borger F.Revol-Junelles AM.Hosri C.et Fanni J(2009).Bacterial diversity of Darfiyeh a lebanese artisanal raw-good's milk cheese-*Food microbial*, 26: 645-652.

Sindic M., Massaux C., Parideans A.M., Lenartz J., Vancutsem F., Bodson B., Sinnaeve G (2010). Valorisation de l'amidon de blé. Incidences des modalités de culture sur les propriétés techno-fonctionnelles. *Presses Agronomiques de Gembloux*.

Sellier, N. & Morin, N (2002). *CultureSciencesChimie* [Page Web]. Accès : <http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/quest-ce-que-la-spectrometrie-de-masse-751>(page consultée le 30 mars 2016).

Samelis J. Maurogenakis F. Metaxopoulor J (1994) characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek Dry Salami. *Inter J. Food Microbol* 23: 179-96-P.

Shah NP(2007). Functional cultures and health benefits *International Dairy Journal*.;17:1262–1277. DOI: 10.1016/j.dairyj.2007.01.014

T

Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 2014; 9:225–241. DOI: 10.1016/j.jff.2014.04.030

V

Van Beek, S., & Priest, F. G (2002). Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: A polyphasic study. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 297-305.

Verachtert, H., & Debourg, A (1995). Properties of Belgian acid beers and their microflora. I. The production of Gueuze and related refreshing acid beers. *Cerevisia*, 20, 37–41.

Von Wright A, Axelsson L(2012). Lactic acid bacteria: an introduction. In: Lahtinen SJ, Ouwehand AC, Salminen S, Von Wright A, editors. *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press;. p. 1–16.

Van Den Berg DJC, Smits A, Pot B, Ledeboer A.M, Kersters K, Verbake JMA, Verrips CT (1993). Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. *Food Biotechnol.* 7:189-205

W

Wacher, C (1993). Alimentos y bebidas fermentados tradicionales. In M. Garcí'a-Garibay, R. Quintero-Ramírez, & A. López Munguía (Eds.), *Bioteconología alimentaria* (pp. 313–349). Mexico, D.F: LIMUSA

Wedajo B (2015). Lactic acid bacteria: benefits, selection criteria and probiotic potential in fermented food. *Journal of Probiotics and Health.*; 3:129–138. DOI: 10.4172/2329-8901.1000129

Wolfe B. E., Dutton R. J. (2016). Fermented Foods as Experimentally Tractable Microbial Ecosystems. *Cell*, 161 : 49-55p.

Wright, A and Axelsson, L (2012). Lactic acid bacteria: An introduction. In: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (4th ed S Lahtinen, A.C. Ouwehand, S. Salminen and A.V Wright) p.775,pp. 2-14. CRC Press Taylor and Francis groupe.
Andrew, J.M. 2008. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 7). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 62: 256-278.

Y

Yao A.A., Egounlety M., Kouame L.P., Thonart P (2009). Les bactéries lactiques dans les aliments ou Boissons amylicés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest: leur utilisation actuelle..

Yateem A.Balba MT. AL.SurrayaiT.Al-Mutairi B.and AL-Daher R (2008). Isolation of Lactic

Acid Bacteria with probiotic potential from camel milk. *International journal of Dairy Science*, 3(4): 194-199.

Yao A.A., Egounlety M., Kouame L.P., Thonart P (2009). Les bactéries lactiques dans les aliments ou Boissons amylicés et fermentés de l'Afrique de l'Ouest: leur utilisation actuelle. *Ann. Méd. Vét.*, 153: 54-65.

Z

Zouaoui, N (2011). Effet des polyphénols sur la résistance à l'infestation fongique dans le grain de blé dur. Mémoire de Magister en Sciences Alimentaires. Université Mentouri de Constantine. 83 p.

Zhou, J. R et Blackburn, GL (2003). Soy phytochemicals and tea bioactive compounds. *J. Nut.* 133 (2): 516-52

Annexe01 : Composition des milieux de culture utilisés**Mannitol mobilité**

Composition pour la préparation d'un litre de milieu.

Peptone :.....	10,0 g
Extrait de viande de bœuf :.....	1,0 g
Chlorure de sodium :.....	75,0 g
Mannitol :.....	10,0 g
Rouge de phénol :.....	0,025 g
Agar-Agar :.....	15,0 g
Eau distillée :.....	qsp 1 Litre

$$pH = 7,4$$

Composition : en grammes par litre d'eau distillée

ONPG

Composition théorique en milligrammes par disque :

Nitro-2-Phényl-ED-Galactopyranoside 1,2

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.....25g

Gélose.....12g

PH=7,4 ; autoclavage 15 minutes à 115°C en position semi-inclinée

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%.

VF (milieu viande-foie gélosé)

Extrait de viande-foie.....30g

Glucose.....2g

Gélose.....6g

PH=7,4 ; Répartir en tubes à essais

PCA (Plat Count Agar)

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone de caséine	6,00
Extrait de levure	3,00
Agar	15,00
pH final à 25°C : 7,0 ± 0,2	

Columbia

(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu de base :

- Polypeptone17,0 g
- Peptone pancréatique de coeur.....3,0 g
- Extrait autolytique de levure.....3,0 g
- Amidon de maïs1,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Agar agar bactériologique.....13,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,2

Chapman

Composant	Quantité (g/L)	Rôle
Extrait de viande de bœuf	1	Apport de facteurs de croissance
Peptones	10	Source d'N, de C et d'énergie
Mannitol	10	Lecture d'un caractère biochimique
Chlorure de sodium	75	Agent sélectif (à forte concentration)
Rouge de Phénol	0.025	Indicateur de pH
Agar	15	Gélifiant
pH	7,4	

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

Composition du Milieu M17

- Peptone de soja : 5g
- Peptone de viande : 2,5g
- Peptone de caséine : 2,5g
 - Extrait de levure : 5g
 - Extrait de viande : 5g
 - Lactose: 5g
 - Acide ascorbique: 0,5g
- Glycérophosphate de sodium: 19g
- Sulfate de magnésium: 0,25g

Annexe02 : Protocole de la coloration de Gram

❖ Coloration de Gram

Cette coloration différentielle a été réalisée dans le but de distinguer les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. La coloration a été faite selon le protocole de **(Roy,1979)**.

Le protocole de la coloration de Gram est réalisé selon les étapes suivantes :

Préparation d'un frottis bactérien sur une lame bien nettoyée ;

- Coloration du frottis au violet de Gentiane pendant une minute ;

- Rinçage avec de l'eau distillée ;
- Fixation de la coloration par du lugol pendant une minute ;
 - Traitement à l'alcool pour la décoloration ;
 - Recoloration par la fuschine pendant une minute ;
- Observation à différents grossissements (10, 40 et 100 X10).

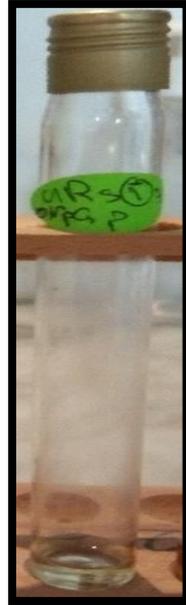
Après l'observation on peut distinguer :

- Les bactéries colorées en violet foncé elles sont dites à gram positif
- Les bactéries colorées en rose elles sont dites à gram négatif

Annexe03 : Résultats de différents tests biochimiques sur les isolats

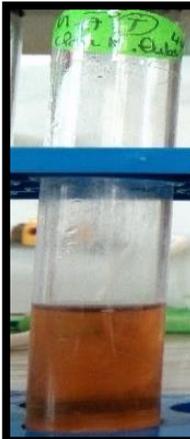
	BFT1	BFT2	BFT3	BFT4	BFT5
Catalase					
Oxydase					

ONPG



LDC, ODC,
ADH



Citrates de Simmons					
clarck et lubs					



Mannitol
mobilité



Résumé

En Algérie et dans certaines régions, le blé dur est fermenté dans des silos souterrains appelés « MATMOURA ». Ce produit, qui est utilisé pour la fabrication d'un type de couscous, a reçu une attention scientifique importante liée à ses biofonctionnalité et la biodiversité de la flore microbienne impliquée dans sa fermentation. Cette étude avait pour objectif la caractérisation phénotypique et biochimique de certaines bactéries lactiques impliquées dans sa fermentation ainsi que l'étude de certaines activités fonctionnelles des bactéries lactiques caractérisées : capacité d'adhésion, formation de biofilm et activité protéolytique. Les résultats obtenus encourageant, qui ont montré la biodiversité de la flore du blé fermenté, méritent d'être confirmés et approfondis.

Mots clés : Blé fermenté du *Matmora*, bactéries lactiques, biofilm, agrégation, activité protéolytique.

Summary

In Algeria and some regions, durum wheat is fermented in underground silos called "MATMOURA". This fermented wheat, which used for the manufacture of a type of couscous, received significant scientific attention related to its biofunctionality and biodiversity of microbial flora involved in its traditional or controlled fermentation. The objective of this study was the characterization of the wheat microbial flora, as well as the isolation and study of the phenotypic and biochemical characteristics of certain lactic acid bacteria involved in wheat fermentation and determining certain of their functional activities: adhesion capacity, biofilm formation and proteolysis activity.

Keywords: Fermented wheat of *Matmora*, lactic acid bacteria, biofilm, aggregation, proteolysis activities.

ملخص

في الجزائر وفي بعض المناطق، يتم تخمير القمح الصلب في صوامع تحت الأرض تسمى "المطمورة". هذا القمح المخمر، الذي يستخدم في تصنيع نوع من الكسكس، يلقي اليوم اهتماماً علمياً هاماً متعلقاً بفعاليتها الحيوية والتنوع البيولوجي للميكروبات المشاركة في عملية تخميره التقليدية أو الخاضعة للرقابة. كان الهدف من هذه الدراسة هو التقييم الجزئي للأحياء الدقيقة للقمح، وكذلك عزل ودراسة الخصائص النمطية والبيو كيميائية لبعض أنواع البكتيريا اللبنية المشاركة في تخمر القمح ودراسة بعض الأنشطة الوظيفية للبكتيريا اللبنية: قدرة الالتصاق وتشكيل بيو فيلم و القدرة على استخدام البروتينات.

الكلمات الدالة: القمح المخمر في المطمورة، البكتيريا اللبنية، البيوفيلم، الالتصاق، النشاط البروتيني.

