



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. Ennadir¹, R. Hassikou¹, G. Al Askari⁴, M. Arahou¹, F. Bouazza¹,
L. Amallah¹, S. A. amine³, K. Khedid²

¹Laboratoire de Botanique, unité de mycologie, Faculté des Sciences, Université Mohammed V-Agdal, 4 Avenue Ibn Battouta, BP 1014 RP, 11000 Rabat-Agdal, Maroc. hassi_rachida@yahoo.fr

²Département de Bactériologie, Institut National d'Hygiène, Av Ibn Batouta, BP 769, Agdal, Rabat, 11000, Maroc. kkhedid200605@yahoo.fr

³Laboratoire d'extraction des acides nucléiques, PCR et PCR en temps réel, Centre National pour la recherche scientifique et technique, angle allal fassi / FAR, BP 8027, Hay Riad, 10000, Rabat, Maroc.

a.sanaa@cnrst.ma

⁴Department of Environmental Science, Faculty of marine sciences and environment, Hodeidah University, Yemen

Received 31 Dec 2013, Revised 18 Apr 2014, Accepted 19 Apr 2014

* Corresponding author. Email: jihaneennadir@hotmail.fr

Abstract

A total of 60 samples of wheat flours sampled from different Moroccan regions have been investigated for their lactic acid bacteria microbial diversity. Among 60 lactic acid bacteria isolates, 30 strains, have been isolated and identified using biochemical and genotypic methods (PCR) and sequencing of the gene coding for phenylalanine 16s rRNA. It has been shown that reliable identification of the isolates required the use of molecular techniques and bioinformatic software with large databases. The results showed that lactic acid bacteria isolated from Moroccan flour belonged to the genera *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Weissella*, with the dominance of *Pediococcus* (63%) compared to the total number of strains, followed by *Enterococcus* with a frequency of 27% and finally *Weissella*, *Lactococcus* and *Lactobacillus* with a frequency of 10%.

Keywords: Flour, lactic acid bacteria, phenotypic characterization, genotypic characterization

Résumé

Un lot de 60 échantillons de farine de blé provenant de différentes régions du Maroc a fait l'objet d'une analyse microbiologique dans le but de déterminer la diversité en bactéries lactiques. Sur 60 bactéries lactiques isolées, 30 souches ont été sélectionnées et retenues pour identification. Dans un premier temps, une caractérisation phénotypique basée sur des critères morphologiques et biochimiques a été effectuée suivie d'une caractérisation génotypique par la méthode PCR et séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S moyennant des techniques moléculaires de pointe et des logiciels bioinformatiques à larges bases de données. Les résultats obtenus ont montré que les bactéries lactiques isolées des farines marocaines appartiennent aux genres *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Weissella* avec une dominance du genre *Pediococcus* (63%) par rapport au nombre total des souches identifiées suivi du genre *Enterococcus* avec une fréquence de 27% et enfin des genres *Weissella*, *Lactococcus* et *Lactobacillus* avec une fréquence de 10%.

Mots clés : Farine, bactéries lactiques, caractérisation phénotypique, caractérisation génotypique

Introduction

Les céréales constituent de loin la ressource alimentaire la plus importante au monde à la fois pour l'alimentation humaine et animale [1]. Le blé (*Triticum spp*), par son important pouvoir nutritionnel, demeure la principale ressource alimentaire de l'Homme [2]. C'est une céréale qui compte parmi les denrées alimentaires jouant un rôle vital et stratégique pour la sécurité alimentaire du pays [3].

Au Maroc, les céréales et leurs dérivés constituent l'épine dorsale du système alimentaire. La consommation moyenne annuelle par habitant est très importante et se chiffre autour de 320 kg [4].

Cependant, les céréales, dont le blé, sont naturellement contaminées par des organismes eucaryotes (moisissures et levures) et procaryotes (bactéries). Cette flore microbienne forme un équilibre très fragile et peut altérer la qualité lors

des différentes phases de préparation de la farine et les produits à base de farine, comme les aliments fermentés et les levains. Par ailleurs, L'équilibre de la population microbienne totale présente dans les grains de blé peut être affecté par de nombreux facteurs. Parmi les facteurs de ce déséquilibre, on cite les conditions climatiques, essentiellement la température et l'humidité et les conditions biotiques liées aux attaques par des insectes et des moisissures et l'application des pesticides. Parmi les microorganismes associés aux farines, les bactéries lactiques (LAB) jouent un rôle très important dans la préservation de l'équilibre de la flore microbienne et la stabilisation des produits finaux de la fermentation [5,6]. Cependant, les travaux au Maroc n'ont jamais fait l'objet d'une investigation sur la biodiversité de la flore lactique des farines. A l'échelle internationale, les seuls travaux, à notre connaissance, publiés dans ce domaine sont ceux de Corsetti *et al.* en 2001 et en 2007 et Robert *et al.* en 2009 sur le blé italien [7, 8, 9] et ceux de Hardy (1982), Bervas (1991) et Infantes et Tourneur (1991) sur le blé français [10,11, 12]. Il est donc nécessaire d'entreprendre une étude pour la caractérisation de la flore lactique des farines marocaines qui sont restées, sur ce plan, pratiquement absentes dans la littérature.

L'utilisation des bactéries lactiques dans l'alimentation est intéressante à plus d'un titre. En effet, outre les fermentations dont elles sont responsables, les bactéries lactiques empêchent la multiplication d'autres espèces bactériennes pathogènes ou susceptibles de dégrader les produits alimentaires. Par exemple, bien que constitué de viande, le saucisson ne s'altère pas grâce à la présence de bactéries lactiques. Ces dernières s'opposent au développement de *Pseudomonas* par le biais de la production d'acide lactique, d'une petite quantité d'eau oxygénée et de lantibiotiques telle la nisine et ce, en exerçant une action protéolytique et lipolytique.

De plus, les bactéries lactiques contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques. Pour toutes ces propriétés, elles sont exploitées dans la technologie des fromages [13].

A l'heure actuelle, les bactéries lactiques sont recherchées pour leurs qualités nutritionnelle et thérapeutique dans des préparations appelées probiotiques et pour la production de bactériocines [14, 15,16, 17, 18,19].

Les bactéries lactiques demeurent encore utilisées sous forme de levains artisanaux, mais le développement de l'industrie de transformation a conduit à la production de ferments industriels capables d'assurer à la fois la qualité et la consistance du produit [14,20]. Ces ferments sont des cultures pures ou un mélange appartenant aux genres : *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Bifidobacterium* [14].

Vue l'importance attribuée aux bactéries lactiques dans les domaines de l'industrie pharmaceutiques et agroalimentaires [21], leur valorisation pourrait avoir de fortes retombées socio-économiques, scientifiques et environnementales. Un aspect de ce volet est évoqué dans le présent travail où on s'est intéressé à l'étude des bactéries lactiques naturellement présentes dans les farines. Pour ce faire, une étude des caractéristiques phénotypiques et ensuite génotypiques des bactéries lactiques isolées a été nécessaire afin d'atteindre l'objectif assigné à ce travail.

2. Matériel et méthodes

2.1 Echantillonnage

La collecte de 60échantillons de farines de (blé dur, blé tendre) a eu lieu dans différentes régions du Maroc. La moitié provient de particuliers de différentes régions (Zair, Settat, Taza, EL Kelâa des Sraghna) et l'autre de différents points de vente de Rabat et de Salé.

2.2 Dénombrement des bactéries lactiques

Le dénombrement des bactéries lactiques associées aux farines a été réalisé par la méthode d'ensemencement en profondeur. Elle consiste à introduire aseptiquement 10 g de chaque échantillon de farine dans des flacons contenant 90 ml d'eau physiologique stérile (0,85 % m/v). Des dilutions décimales allant de 10^{-1} jusqu'à 10^{-4} ont été préparées à partir du même diluant et ensuite ensemencées dans différents milieux de culture MRS (Oxoid, Angleterre), M17 (Oxoid, Angleterre) et Elikor (Oxoid, Angleterre) selon le procédé d'isolement des bactéries lactiques indiqué dans le tableau 1.

Tableau 1 : Milieux de culture utilisés et conditions d'incubation pour l'isolement des bactéries lactiques.

Microorganismes	Milieux d'isolement	T(°C)	Durée(h)	Incubation
Streptocoques et Enterocoques	M17 [22]	45	48	Aérobiose
Lactocoques	Elikor [23]	30	48	Aérobiose
Lactobacilles et Pediocoques	MRS [24]	30	48	Aérobiose

Le comptage des colonies formées a lieu après une durée et une température d'incubation adéquates pour chaque groupe bactérien.

En cas d'absence de croissance, l'isolement des bactéries lactiques a été réalisé après enrichissement de 10g de chaque échantillon dans 50ml de bouillon MRS et M17 (Oxoid, Angleterre), pendant 3 jours d'incubation à 30°C et à 45°C respectivement. Ensuite, 1 ml de chaque culture obtenue a été étalé en surface des géloses MRS et M17.

Les cultures pures sont maintenues dans des cryotubes contenant le bouillon de MRS additionné de 30% de glycérol (v/v)

à -20°C. Avant utilisation, les isolats stockés sont activés par transfert de 1% d'inoculum dans le bouillon MRS incubé à 30°C pendant 24h et subcultivés sur la gélose MRS à 30°C pendant 24h [25].

2.3 Identification des bactéries lactiques

2.3.1 Caractérisation phénotypique

L'identification des isolats de bactéries lactiques au stade genre a été réalisée à l'aide d'une étude morphologique et physiologique. La première consiste à tester tous les isolats par la coloration de Gram et l'observation microscopique afin de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et le mode de regroupement, et de confirmer l'absence de la formation de spores. Quant à l'étude physiologique, elle consiste à soumettre les isolats aux tests suivants : recherche de la catalase, de capacité de croissance à différentes températures (10, 30, 40, 45 et 50°C), à différents pH (6.5, 9.2, et 9.6) et à différentes concentrations en NaCl (2, 3, 4, 6.2 et 10%), la détermination du type fermentaire par la mise en évidence de la production de gaz (CO₂) et de production des acides à partir des hydrates de carbonés.

2.3.2 Caractérisation génotypique

a. Extraction d'ADN

L'extraction et la purification d'ADN a été réalisée par le Kit GenElute *Bacterial Genomic DNA Kit* (Sigma Aldrich, Allemagne) après culture de la souche à identifier dans 5 ml de bouillon MRS pendant 16 heures à 30°C.

La détermination de la concentration d'ADN a été obtenue par le dosage au spectrophotomètre Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). La pureté de l'ADN a été évaluée par le rapport des densités optiques DO 260/280 nm. Un extrait d'ADN de bonne qualité donne un rapport compris entre 1,8 et 2.

L'ADN est libéré par lyse de quelques colonies bactériennes durant une incubation de 30 minutes à 55°C en présence de la protéinase K et d'un tampon de lyse. Pour précipiter l'ADN génomique sur la membrane de la colonne, il est nécessaire d'ajouter l'éthanol au lysat. L'ADN génomique une fois fixé sur la membrane de la colonne, les contaminants sont éliminés par deux solutions de lavage WS1 suivie de WSC2.

L'éluion de l'ADN génomique se fait par ajout de 200µl de TE (Tris EDTA) sur la colonne suivie d'une centrifugation membrane.

b. PCR (Polymerase Chain Reaction)

➤ Préparation des mélanges réactionnels

La réaction de polymérisation en chaîne PCR consiste à multiplier la séquence du gène de l'ADNr 16S à l'aide d'amorces spécifiques (Fd₁ et RP₂) encadrant la séquence de ce gène et générant un amplicon de 1500bp.

Amorce	Séquence 5'→3'
Fd₁	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
RP₂	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'

Les réactions PCR sont réalisées dans un volume total de 25 µl contenant le tampon de réaction au 1/10 du volume final et qui contient 10mM de chaque deoxyribonucléoside triphosphate (dNTP), 50mM MgCl₂, 20pmol de chaque amorce, 5U de la Taq polymérase et 5µl de l'échantillon d'ADN. Dans le témoin négatif, les 5 µl d'ADN sont remplacés par 5 µl d'H₂O stérile (Tableau 2).

Tableau 2 : Mélange réactionnel de la PCR

Réactifs (Tampon et Taq platinium d'Invitrogen)	Quantités en (µl) pour un tube
Tampon 10x	2.5
dNTP 10Mm	2
Amorces Fd1 (100uM)	0.125
Amorce RP2 (100uM)	0.125
MgCL2 (50mM)	0.75
Taq DNA polymerase 5U/ul	0.2
H2O	14.3
ADN (30ng/ul)	5

Les microtubes sont ensuite placés dans un thermocycleur (Verity,ABI). Les amplifications sont réalisées selon le programme mentionné dans le tableau 3.

➤ Electrophorèse des produits de la réaction PCR

A la fin de l'amplification, un aliquote de 10µl de chaque amplifiat est mélangé avec 2µl d'un tampon de charge (Promega, USA). Les différents mélanges sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (poids/volume) dans le tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE 1x) préparé à partir d'une solution mère concentrée 10X (Promega, USA) pendant une demi-heure à

100V. Le 1Kb stepladder (Promega, USA) est utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Le Gel a été ensuite photographié sur le GBOX, SYNGENE, l'acquisition et l'analyse de l'image est réalisée par le logiciel GenSnap.

➤ *Purification des produits PCR*

La purification des produits PCR a été réalisée par l'enzyme Exosap. 2 µl de cet enzyme est directement ajouté au produit PCR, le tout est incubé à 37°C pendant 15 min, suivie d'une inactivation par chauffage à 80°C pendant 15 min. On prélève 1 µl du produit PCR purifié pour le doser au Nanodrop (Thermo Fisher scientifique).

Tableau 3 : Programme établi pour l'amplification PCR par le thermocycleur Verity

Etapes	T °C	Temps	Cycle
Dénaturation préliminaire	94	2min	1
Dénaturation	94	40s	10
Hybridation	60	60s	
Elongation	72	120s	
Dénaturation	94	40s	25
Hybridation	50	60s	
Elongation	72	60s	
Elongation finale	72	3min	2

c. *Séquençage de la sous unité ribosomale 16S*

➤ *Séquençage par la technique de Sanger*

Les amplicons ont été séquencés par la technique de Sanger [26] en utilisant le kit BigDye v3.1 d'Applied Biosystems et les amorces de la PCR (Fd₁ et Rp₂). La réaction de séquençage consiste à avoir un mix constitué de 1 µl du BigDye (contient les ddNTPS, dNTP, Enzyme, tampon) plus 3 µl du tampon de séquençage 5x (pour diluer le BigDye), le volume total des amorces, d'eau et de produit PCR étant de 6 µl.

➤ *Purification des produits de la réaction de séquençage*

Pour la purification de la réaction de séquençage, on utilise le kit BigDye X Terminator (Applied Biosystems) constitué de deux réactifs (Solution SAM et X Terminator). Après réaction de séquençage, on centrifuge la plaque pendant 1 min à 1000 rpm puis on ajoute 45 µl de la solution SAM (tampon) et 10 µl du réactif X terminator, suite à une période d'agitation continu de 30 min à 1800 rpm, le X terminator capte les ddNTPS non incorporés. Une seconde centrifugation de 2 min à 1000 rpm est nécessaire pour finaliser la préparation de la plaque pour le séquençage.

➤ *Lecture des séquences sur analyseur génétique (automate d'électrophorèse seize capillaire : ABI 3130xl)*

Les divers fragments à séquencer sont d'abord séparés selon leur taille par électrophorèse capillaire. La répartition a lieu sous l'action d'un courant électrique dans un automate d'électrophorèse à 16 capillaire ABI 3130xl en utilisant le logiciel data collection v3.0 (Applied Biosystems).

d. *Analyse des séquences et identification des bactéries*

➤ *Alignement des séquences*

Après l'électrophorèse capillaire, les séquences obtenues sont alignées par le logiciel sequencing analysis v 5.3.1 (Applied Biosystems) et corrigées manuellement pour résoudre des anomalies entre les deux brins sens et antisens.

➤ *Détermination de l'espèce bactérienne*

Les séquences sont comparées aux séquences homologues contenues dans les banques de données de séquence à travers le portail NCBI (National Center for Biotechnology Information : (<http://www.ncbi.gov/Blast.cgi>) en utilisant le programme Blast (Basic Local Alignment Search Tools).

➤ *Critères d'identification*

L'identification du genre ou de l'espèce est effectuée selon les critères suivants [27] :

- Si la comparaison de la séquence obtenue avec une séquence d'une espèce de référence classifiée a rapporté des pourcentages de similitude $\geq 99\%$, l'isolat inconnu sera assigné à cette espèce.
- Si les pourcentages sont entre 97% et 99% l'isolat inconnu sera assigné au genre correspondant.
- Si les pourcentages sont $< 97\%$, l'isolat inconnu sera assigné à une famille

3. Résultats et discussion

3.1 Dénombrement des bactéries lactiques

Globalement, les résultats du dénombrement des bactéries lactiques ont affiché des valeurs faibles dans la majorité des échantillons de farines étudiés. La charge de ses farines en bactéries présumées *Pediococcus* varie entre 2×10^2 à 6×10^2 ufc/g alors que celles présumées de *Lactobacillus*, *Weissella* et *Lactococcus* est en moyenne de 10 ufc/g. La teneur en *Enterococcus* varie de 10^2 à 3×10^2 ufc/g. Un total de 60 isolats de bactéries lactiques a été obtenu à partir des différents échantillons de farines. Notre étude a porté sur les bactéries lactiques ayant montré un pouvoir antibactérien vis-à-vis des bactéries pathogènes. Ainsi, un total de 30 bactéries lactiques a fait l'objet d'une identification phénotypique et génotypique.

3.2 Identification des bactéries lactiques

➤ Caractérisation phénotypique

Les résultats des tests morphologiques ont montré que toutes les souches possèdent un Gram positif et catalase négative. Le tableau n°4 autorise plusieurs remarques.

Tableau 4: Caractéristiques biochimiques des bactéries lactiques isolées des farines Marocaines

Souches	CO ₂	M a	VP	Hydrolyse de		Température (°C)					pH					NACL(%)					Fermentation des sucres											
				ADH	citrate	1 0	30	40	45	50	6, 5	9, 2	9, 6	2	3	4	6, 2	10	G L	F	G	X	A	R	S	S a	M an	M	D	L		
<i>E. hirae</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	+		+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+			
<i>E. faecium</i>	-	-		+	-	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-				
<i>P. acidilactici</i>	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-				
<i>P. pentosaceus</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+				
<i>W. confusa</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+				
<i>L. plantarum</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+				
<i>L. lactis</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+				

VP : voges-proskauer (la mise en évidence de la production d'acétoïne au cours de la fermentation butylique glycolique) ; ADH : Arginine dihydrolase ; Ma : Mannitol ; GL : Glucose ; F : Fructose ; G : Galactose ; X : Xylose ; A : Arabinose ; R : Ribose ; S : Sucrose ; Sa : Saccharose ; Man : Mannose ; M : Maltose ; D : Dextrose ; L : Levulose ; + : Test positif ; - : Test négatif.

D'une part, les analyses ont montré que toutes les bactéries lactiques sont des bactéries homofermentaires à l'exception d'une seule souche hétérofermentaire identifiée comme *Lactobacillus plantarum*. D'autre part, ces souches sont également, toutes capables de croître à 30°C, à pH 6,5 et en présence de 4% de NaCl. Toutes les souches fermentent le glucose tandis que la fermentation des autres sucres est variable d'une espèce à l'autre.

L'identification phénotypique des bactéries lactiques retenues permet d'avancer qu'il existe une biodiversité intéressante. Cependant, la caractérisation phénotypique, bien qu'elle constitue une étape fondamentale et préliminaire, elle reste sommaire et imprécise. Aussi et afin d'attribuer des profils acceptables et fiables aux souches sélectionnées, une identification moléculaire s'avère indispensable et obligatoire.

➤ Caractérisation moléculaire

Les résultats de l'identification moléculaire des bactéries lactiques sont indiqués dans les tableaux 5 et 6. Le séquençage par la méthode moléculaire de Sanger et al. (1997) a permis l'individualisation de 3 groupes de bactéries lactiques à savoir:

- Un premier groupe caractérisé par le genre *Pediococcus* avec une fréquence de 19 isolats, soit 63 % du nombre total des souches identifiées avec une dominance de l'espèce *Pediococcus acidilactici* avec 18 isolats, soit 95% par rapport au nombre total des souches de genre *Pediococcus*.
- Un second groupe représenté par le genre *Enterococcus* avec une fréquence de 8 isolats, soit 27 % du nombre total des souches identifiées dont 4 isolats d'*Enterococcus hirae* et 4 isolats d'*Enterococcus faecium* enregistrant un même pourcentage qui est de 50%.
- Un troisième groupe qui regroupe les genres *Weissella*, *Lactococcus* et *Lactobacillus* avec une fréquence de 10% dont les seules espèces isolées sont *Weissella confusa*, *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum*.

Notre étude a porté sur la caractérisation de la biodiversité de la flore lactique des farines d'origine végétale (blé dur et tendre).

A l'analyse de nos résultats, cette étude a permis de mettre en évidence l'existence d'une flore lactique dans les farines de blé. Le comptage des colonies a montré que le nombre des bactéries lactiques varie entre 10 et $6 \cdot 10^2$ ufc/g. Sur ce point, certains travaux comme ceux de Corsetti et al. en 2001 et en 2007 ont montré que le nombre des bactéries lactiques isolées des farines de blé italien varie respectivement de log 7,5 à 9,3 ufc/g et de 1 à $16 \cdot 10^2$ ufc/g [7,8]. Dans le même ordre d'idée, certains auteurs admettent par leurs travaux que comparativement avec les produits d'origine animale, les végétaux renferment, en général, un faible nombre de bactéries lactiques [28].

Tableau 5 : Identification des bactéries lactiques isolées de la farine de blé par la technique de l'ARNr16s

b. Souches	Identification moléculaire	%I.D
c. 1	<i>Enterococcus hirae</i>	99
2	<i>Enterococcus faecium</i>	100
3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99
4	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99
5	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100
6	<i>Enterococcus faecium</i>	99
7	<i>Weissella confusa</i>	100
8	<i>Enterococcus hirae</i>	100
9	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100
10	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100
11	<i>Enterococcus hirae</i>	100
12	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100
13	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100
14	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99
15	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100
16	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100
17	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100
18	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100
19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
20	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100
21	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100
22	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99
23	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99
24	<i>Enterococcus hirae</i>	99
25	<i>Lactococcus lactis</i>	99
26	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99
27	<i>Enterococcus faecium</i>	100
28	<i>Enterococcus faecium</i>	100
29	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100
30	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100

I.D : pourcentage d'identification

Tableau 6 : Distribution des espèces de bactéries lactiques isolées identifiées par PCR

Genres	Espèces	Nombre d'isolats	% par rapport au total des isolats
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	18	63
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	4	27
	<i>Enterococcus faecium</i>	4	
<i>Weissella</i>	<i>Weissella confusa</i>	1	3,33
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	1	3,33
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	3,33

} 10

Dans tous les cas, la structure, la composition et les interactions microbiennes des communautés bactériennes peuvent être affectées par de nombreux facteurs [29].

Par ailleurs, l'identification des bactéries lactiques isolées a permis d'avancer que la biodiversité en flore lactique des farines marocaines est riche en *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* et en *Weissella*. Dans notre cas, les bactéries lactiques les plus fréquemment détectées sont les *Pediococcus* essentiellement représentés par l'espèce *Pediococcus acidilactici*. En revanche, Corsetti et al. en 2007 et Robert et al. en 2009 ont avancé que ce sont plutôt les entérocoques et les lactobacilles les espèces les plus dominantes dans les farines de blé italien [8, 9].

D'autres auteurs ont rapporté que parmi les bactéries lactiques isolées des farines, les espèces *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus pentosaceus* sont les plus fréquentes et représentent plus de 85% des isolats homofermentaires [30, 31, 32].

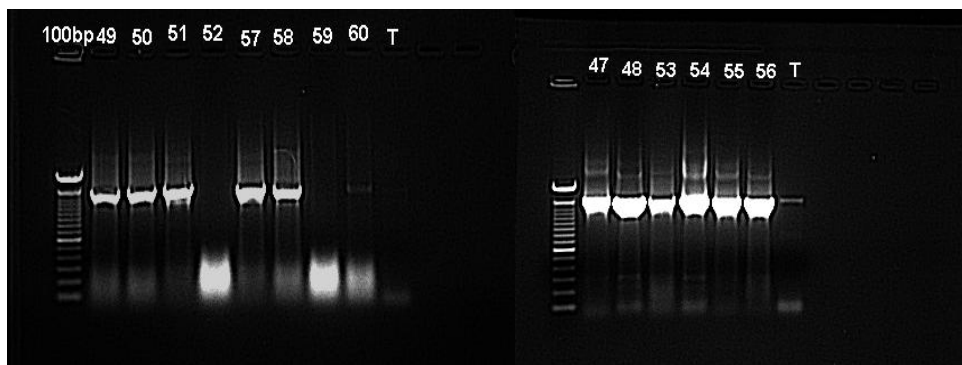


Photo 1 : Gel d'électrophorèse des produits de la PCR des isolats de bactéries lactiques (Photos visualisées par le système de photo documentation « GBox »)

Dans le même ordre d'idée, certains auteurs ont avancé que *Pediococcus pentosaceus* était la seule espèce de ce genre qui a été détectée dans tous les levains étudiés et peut être appliquée comme démarreur de la production de pain au levain [33, 34]. Dans notre cas, rappelons que l'espèce *Pediococcus acidilactici* est la plus fréquente, ce résultat rejoint celui trouvé par Hardy (1982), Bervas (1991) et Infantes et Tourneur (1991) lors de leurs investigations sur la microflore lactique des farines de blé français [10, 11, 12].

Louembé et al. 2003 ont signalé qu'en général, les *Pediococcus* sont fréquemment isolés de plusieurs produits végétaux (céréales, choucroutes, concombres, olives et fruits) ainsi que de produits carnés et de produits fermentés comme la bière [35].

Concernant les entérocoques, ils sont moins fréquemment isolés puisqu'ils n'ont été identifiés que dans 8 échantillons seulement, et sont représentés par deux espèces *Enterococcus hirae* et *Enterococcus faecium*.

Comparativement aux études de Corsetti et al. (2007), les entérocoques ont été les plus isolés des échantillons de blé et sont principalement représentés par les espèces *Enterococcus faecium* et *Enterococcus mundtii* [8]. Sur ce point, Devriese et al. 1992 ont ajouté que les entérocoques sont des contaminants naturels de l'intestin des animaux à sang chaud. Ils sont également présents sur les parties aériennes des végétaux (céréales et plantes fourragères) [36, 37, 38] et participent à la fermentation des aliments (Franz et al., 1999). 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 [39,40, 41, 42]. Par ailleurs, la présence des espèces *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* et *Weissella confusa* dans les farines marocaines avec des proportions faibles est similaire à ce qui a été signalé par Corsetti et al. (2001) [7] lors d'une étude sur les farines de blé italien. Ces espèces sont représentées avec des pourcentages légèrement différents de nos résultats et qui sont de l'ordre de 7, 6 et 2% respectivement pour les espèces *Lactobacillus plantarum*, *Weissella confusa* et *Lactococcus lactis*.

Les deux espèces *Lactobacillus plantarum* et *Lactococcus lactis* sont en effet des espèces communément isolées à des fréquences variables de différents produits fermentés, des levains, des produits laitiers et des produits végétaux [43, 44]. Gobbetti et al. en 1994 et Corsetti et al. en 2001 ont rapporté que l'espèce *Lactobacillus plantarum* a été isolée des farines italiennes avec une faible fréquence. Contrairement aux travaux effectués par Ricciardi et al. en 2005 sur le levain utilisé dans la préparation du pain traditionnel du blé dur italien, le microorganisme le plus dominant est *Lactobacillus plantarum* avec une fréquence de 49% [45, 7, 46].

Une seule espèce hétérofermentaire de *Weissella* a été isolée dans cette étude, il s'agit de *Weissella confusa*. Des observations similaires ont été signalées par Robert et al. (2009) lors de leur étude sur la biodiversité de la flore lactique des farines de blé français. Le genre *Weissella* a été isolé à partir de végétaux frais, de la canne à sucre, de la viande et occasionnellement du lait cru, mais à notre connaissance, son rôle technologique dans la fermentation n'a jamais été relaté dans la littérature [9, 47,48].

Conclusion

À la lumière des résultats obtenus lors de cette étude, il est permis de conclure que les farines marocaines disposent d'une biodiversité riche en bactéries lactiques et que ses produits céréaliers peuvent être une source précieuse de souches ayant des propriétés technologiques et thérapeutiques intéressantes.

La découverte de cette biodiversité dans toute sa richesse, ouvre donc une voie prometteuse pour la valorisation de ces ressources naturelles par le biais de la recherche de propriétés biotechnologiques, de souches probiotiques parmi les souches isolées et de l'étude de leur capacité à produire des bactériocines.

Références

1. Choueiri E., Ministère de l'Agriculture, Direction des Etudes et de la Coordination, Projet "Assistance au Recensement Agricole", FAO, Octobre (2003).
2. Multon J.L., Technique et documentation, Édition Lavoisier, Paris, *Apria*. 1 (1982) 576.
3. Molinité A., Pfohl-Leszkoicz A., Laboratoire de Toxicologie et sécurité alimentaire- Auzeville- Tolosane, Note de l'ASEDISSO No. spécial Mycotoxines, (2003), pp. 9
4. Bartali E., FAO, (1995). http://www.cd3wd.com/cd3wd_40/INPHO/VLIBRARY/MOVE_REP/X0289E/FR/X0289F00.HTM
5. Mensah P., Tomkins A.M., Drasar B.S., Harrison T.J., *J. Appl. Bacteriol.* 70 (1991) 203–210.
6. Caplice E., Fitzgerald G.F., *Int. J. Food Microbiol.* 50 (1999) 131–149.
7. Corsetti A., Lavermicocca P., Morea M., Baruzzi F., Tosti N., Gobbetti M., *Int. J. Food. Microbiol.* 64 (2001) 95.
8. Corsetti A., Settannia L., Chaves Lo'peza C., Giovanna E.F., Mastrangelo M., Giovanna S., *Sys. Appl. Microbiol.* 30 (2007) 561.
9. Robert H., Gabriel V., Fontagné-Faucher C., *Int. J. Food. Microbiol.* 135 (2009) 53–59.
10. Hardy J.L., PhD Thesis, Université Technologique de Compiègne, France, (1982).
11. Bervas E., PhD Thesis, Université de Clermont-Ferrand II, France, (1991).
12. Infantes M., Tourneur C., *Sci. aliments.* 11 (1991) 527–545.
13. Gorenflot R., Gern M., Doin éditeurs, Paris, France, (1989), pp. 242
14. Leveau J.Y., Bouix M., Tec et Doc Lavoisier, Paris, France, (1993).
15. Patrignani F., Lanciotti R., Mathara J. M., Guerzoni M. E., Holzapfel W. H., *Int. J. Food Microbiol.* 107 (2006) 1–11.
16. Steijns J. N., *Int. Dairy J.* 18 (2008) 425–435.
17. Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L., *Int. J. Food. Microbiol.* 71 (2001) 1–20.
18. Paul Ross R., Morgan S., Hill C., *Int. J. Food. Microbiol.* 79 (2002) 3–16.
19. Touré R., Kheadr E., Lacroix C., Moroni O., Fliess I., *J. Appl. Microbiol.* 95 (2003) 1058–1069.
20. Pfeiler E.A., Klaenhammer T.R., *Trends Microbiol.* 12 (2007) 546–553.
21. Holzapfel W.H., *Int. J. Food. Microbiol.* 75 (2002) 197–212.
22. Terzaghi B.E., Sandine W.E., *Appl. Environ. Microbiol.* 29 (1975) 807–813.
23. Elliker P.R., Anderson A.W., Hannesson G., *J. Dairy. Sci.* 39 (1956) 1611–1612.
24. De Man J., Rogosa M., Sharpe M.E., *J. Appl. Bacteriol.* 23 (1960) 130–135.
25. Khedid K., Thèse du Doctorat National, Université Ibn Tofail (Maroc), (2006).
26. Sanger F., Air G. M., Barrell B.G., Brown N.L., Coulson A.R., Fiddes C.A., Hutchison C.A., Slocombe P.M., Smith M., *Nature.* 265 (1977) 687–695.
27. Drancourt M., Bollet C., Carlioz A., Martelin R., Gayral J.P., Raoult D., *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 3623–3630.
28. Nguyen-The C., Carlin F., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34 (1994) 371–401.
29. Araujo W.L., Marcon J., Maccheroni Jr. W., Van Elsas J.D., Van Vuurde J.W.L., Azevedo J.L., *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 4906–4914
30. De Vuyst L., Neyssens P., *Trends in Food Sci. Tech.* 16 (2005) 43–56.
31. De Vuyst L., Vancanneyt M., *Food Microbiol.* 2 (2007) 120–127.
32. Corsetti A., Settanni L., *Food Res. Int.* 40 (2007) 539–558.
33. Katina K., Sauri M., Alakomi H.L., Mattila-Sandholm T., *LWT-Food Sci. Tech.* 35 (2002) 38–45.
34. Paramithiotis S., Chouliaras Y., Tsakalidou E., Kalantzopoulos G., *Process. Biochemistry.* 40 (8) (2005) 2813–2819.
35. Louembé D., Kéléké S., Kobawila S.C., Nzouzi J.P. *Tropicultura.* 21 (1) (2003) 3–9.
36. Devriese L.A., Collins M.D., Wirth R. in: Balows A., Tru'per H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H., eds. *The Prokaryotes*, Springer, New York, (1992) 1465–1481
37. Franz C.M.A.P., Holzapfel W.H., Stiles M.E., *In. J. Food Microbiol.* 47 (1999) 1–24.
38. Mundt J.O., Hammer J.L., *Appl. Microbiol.*, 16 (1968) 1326–1330.
39. Ruiz-Moyano S., Martin A., Benito M.J., Nevado F.P., Cordoba M.G., *Meat Science.* 80 (2008) 715–721.
40. Gracia Fontán M.C., Lorenzo J.M., Martinez S., Franco I., Carballo J., *LWT - Food Sci. Tech.* 40 (2007) 1610.
41. Moreno M.R.F., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De vuyst L., *Int. J. Food. Microbiol.* 106 (2006) 1–24.
42. Ammor S., Rachman C., Chaillou S., et al., *Food. Microbiol.* 22(2005) 373–382.
43. Tanasupawat S., Ezaki T., Suzuki K., Okada S., Komagata K., Kozaki M., *J. General. Appl. Microbiol.* 38 (1992) 121.
44. Tanasupawat S., Thongsanit J., Okada S., Komagata K., *J. General. Appl. Microbiol.* 48 (2002) 201–209.
45. Gobbetti M., Corsetti A., Rossi J., La Rosa F., De Vincenzi S., *Italian J. Food. Sci.* 6 (1994) 85–94.
46. Ricciardi A., Parente E., Piraino P., Paraggio M., Romano P., *Int. J. Food. Microbiol.* 98 (2005) 63–72.
47. Björkroth K. J., Schillinger U., Geisen R., Weiss N., Hoste B., Holzapfel W. H., Korkeala H.J., Vandamme P., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2002) 141–148.
48. Mathara J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K., Holzapfel W.H., *Int. J. Food Microbiol.* 94 (2004) 269.