

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Frères Mentouri-Constantine 1
Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires
(I.N.A.T.A.A)



N° ordre :
N° série :

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Spécialité : Sciences alimentaires

RYMA MERABTI

Blé dur fermenté *lemzeiet* : étude du nouveau procédé de fermentation à l'extérieur du *matmor* et caractérisation de l'écosystème (interactions du microbiote avec la matrice)

Devant le jury :

Président :	Prof. KARAM Nouredine	Univ. Es-Sénia. Oran
Rapporteur :	Prof. BEKHOUCHE Farida	Univ. Frères Mentouri. Constantine 1
Examineurs :	Prof. KHAROUB Karima	Univ. Frères Mentouri. Constantine 1
	Prof. BARKAT Malika	Univ. Frères Mentouri. Constantine 1
	Prof. MADANI Khodir	Univ. Abderrahmane Mira. Bejaia
	Prof. ARHAB Rabah	Univ. Larbi Ben M'Hidi. Oum El bouaghi
Invitée :	Dr. VALENCE Florence	CIRM-BIA. INRA. Rennes

2014-2015

Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à remercier tous les membres du jury. Je remercie, particulièrement, Monsieur le Professeur KARAM Noureddine de m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Je suis également reconnaissante envers les Professeurs ; Madame KHAROUB Karima, Madame BARKAT Malika, Monsieur MADANI Khodir, et Monsieur ARHAB Rabah d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Je tiens aussi à remercier Madame le Professeur BEKHOUCHE Farida, d'avoir été la directrice de cette thèse. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a accordée pendant la réalisation de ces travaux, pour son encadrement scientifique, sa disponibilité et ses encouragements.

J'adresse ma profonde gratitude à Madame VALENCE Florence, Responsable du CIRM-BIA à l'INRA de Rennes, pour l'accueil chaleureux, son encadrement et de m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail. Je la remercie également pour l'honneur qu'elle me fait en participant au jury.

Je souhaite remercier sincèrement Madame THIERRY Anne, Directrice de Recherche à l'INRA de Rennes, pour son investissement, ses conseils scientifiques et sa contribution lors de l'analyse des composés volatils, des traitements statistiques et de la rédaction de mon article.

Je remercie infiniment Mademoiselle Chuat Victoria et Madame Madec Marie-Noelle, techniciennes au CIRM-BIA, pour leur soutien, encouragement et surtout leur disponibilité.

Merci à Monsieur BAILLY Jean-Denis, enseignant chercheur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, et à Madame Bailly Sylviane pour leur aide lors des analyses mycologiques.

Mes remerciements vont également à ma famille, ma mère ainsi que mes frères et ma sœur qui m'ont toujours soutenue et encouragée à poursuivre dans cette voie. En fin, je remercie tous ceux qui ont croisé ma route pendant ces années, et qui directement ou indirectement ont contribué à l'accomplissement de cette thèse.

A mon regretté papa

A ma maman

A Mohammed

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux

INTRODUCTION GENERALE.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. CEREALES ET FERMENTATION.....	7
1.1 Céréales	7
1.2 Catégories et technologies de la fermentation des céréales.....	10
1.2.1 Maltage	10
1.2.2 Starters mixtes d'origine ethnique	12
1.2.3 Pâtes fermentées.....	14
1.2.4 Exemple d'enzymes hydrolytiques de sources externes la Chicha.....	16
1.3 Aliments et boissons fermentées à base de céréales.....	16
1.4 Blé fermenté en Algérie.....	19
2. MICROBIOTE DES ALIMENTS FERMENTES A BASE DE CEREALES.....	21
2.1 Flore lactique et céréales fermentées.....	21
2.1.1 Propriétés et caractérisation des BL.....	21
2.1.2 Bactéries lactiques impliquées dans la fermentation des céréales	24
2.2 Flore fongique et céréales fermentées	25
2.2.1 Propriétés et caractérisation de la flore fongique.....	25
2.2.2 Flore fongique impliquée dans la fermentation des céréales	27
3. LES METHODES MOLECULAIRES DE CARACTERISATION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS LES MATRICES ALIMENTAIRES	28
3.1 Méthodes culture-indépendantes	28
3.1.1 Temporal temperature gradient gel electrophoresis/denaturing gradient gel electrophoresis -TTGE/DGGE.....	28
3.1.2 Terminal restriction fragment length polymorphism -T-RFLP	31
3.1.3 Autres méthodes d'empreintes moléculaires	33
3.1.4 Les nouvelles méthodes de séquençage à haut –débit	33
3.2 Méthodes culture-dépendantes	34
4. MODIFICATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DURANT LA FERMENTATION DES CEREALES.....	38
4.1 Action sur les principaux substrats.....	38
4.1.1 L'amidon.....	38
4.1.2 Les protéines	39
4.1.3 Les lipides	39

4.2 Importance de la fermentation des céréales.....	41
4.2.1 La biopréservation.....	41
4.2.2 Composés bioactifs et probiotiques.....	42
4.2.3 Composés aromatiques et volatils.....	43
4.2.4 Vitamines et minéraux.....	45
ETUDE EXPERIMENTALE	46
CHAPITRE 1: ENQUETE ET REPRODUCTION DU NOUVEAU PROCEDE DE FERMENTATION.....	47
1.1 Enquête.....	47
1.1.1 Objectif.....	47
1.1.2 Matériel.....	47
1.1.3 Lieu et période de l’investigation.....	48
1.1.4 Résultats.....	48
1.1.5 Discussion.....	52
1.1.6 Conclusion.....	52
1.2 Reproduction expérimentale du procédé de fermentation.....	52
1.2.1 Matériels et méthodes.....	52
1.2.2 Résultats.....	56
1.2.3 Discussion.....	56
1.2.4 Conclusion.....	58
CHAPITRE 2: EVALUATION ET CARACTERISATION DU MICROBIOTE DU BLE FERMENTE.....	59
2.1 Matériels et méthodes.....	59
2.1.1 Isolement et dénombrement de la flore fongique.....	59
2.1.2 Isolement et dénombrement de la flore lactique.....	60
2.2 Résultats.....	61
2.2.1 Flore fongique.....	61
2.2.2 Flore lactique.....	65
2.3 Discussion.....	69
2.4 Conclusion.....	70
CHAPITRE 3: CARACTERISATION MOLECULAIRE DES BL ISOLEES.....	71
3.1 Matériels et méthodes.....	72
3.1.1 Identification moléculaire des 69 isolats sélectionnés.....	72
3.1.2 Analyse de la biodiversité clonale des bactéries lactiques.....	76
3.1.3 Identification de la flore lactique du blé fermenté par la méthode culture- indépendante TTGE.....	82
3.2 Résultats.....	86
3.2.1 Identification moléculaire des bactéries lactiques.....	86
3.2.2 La TTGE.....	91
3.2.3 Diversité clonale des bactéries lactiques.....	91
3.3 Discussion.....	96

3.4 Conclusion	98
CHAPITRE 4: EFFET DE L'ACTIVITE DES BACTERIES LACTIQUES SUR LES MODIFICATIONS DE LA MATRICE DU BLE FERMENTE	99
4.1 Matériels et méthodes	99
4.1.1 Analyses physico-chimiques	99
4.1.2 Dosage des acides aminés	100
4.1.3 Analyse des composés volatils par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)	103
4.1.4 Profils enzymatiques des espèces identifiées	104
4.1.5 Analyse statistique	105
4.2 Résultats	107
4.2.1 Analyses physico-chimiques	107
4.2.2 Acides aminés	109
4.2.3 Composés volatils	116
4.2.4 Activité enzymatique	121
4.3 Discussion	126
4.4 Conclusion	130
 <i>DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION</i>	 131
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</i>	135
<i>ANNEXES.....</i>	149
<i>RESUMES.....</i>	174

LISTE DES ABREVIATIONS

AACC : American Association of Cereal Chemists
ACP : Analyse en composante principale
ADN : Acide désoxyribonucléique
AG : Acidité grasse
ANOVA : Analyse de la variance
ARN: Acide ribonucléique
AT: Acidité titrable
B : Blé fermenté sans vinaigre
BHYE: Brain heart infusion yeast extract
BL: Bactéries lactiques
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
CPG : Chromatographie en phase gazeuse
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DMDS : Dimethyl disulfide
DMS : Dimethyl sulfide
EMP : Embden-Meyerhof-Parnas
FAO : Food and Agriculture Organization
GABA : Acide gamma-aminobutyrique
GB : Gigabit
HS : Headspace
kPa : Kilopascal
LSD : Least significant difference
MA : Malt agar
MB : Mégabit
min : Minute
MRS : Man Rogosa and Sharpe
NCBI : National Center for Biotechnology Information
OAIC : Office algérien interprofessionnel des céréales
OTU : Unité taxonomique opérationnelle
pb : Paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
PFGE : Pulsed-field gel electrophoresis
PG/PK : Phosphogluconate/Phosphoketolase
pheS : Phenylalanyl-t-RNA synthetase alpha-subunit
RAPD : Random amplified polymorphic DNA
rpoA : RNA polymerase alpha-subunit
RT : Reverse-transcription
s : Seconde
SM : Spectrométrie de masse
SNG : Séquençage nouvelle génération
SSCP : Single strand conformation polymorphism
T0 : Blé non-fermenté
T-RFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
TTGE : Temporal temperature gradient gel electrophoresis
UFC : Unité formant colonie
UPGMA : Unweighted pair group method with arithmetic mean
V : Blé fermenté avec vinaigre
V3 : région du gène de l'ARNr16S
VBNC : Viable but non culturable

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Relation phylogénétique entre les céréales et les pseudo-céréales produites et consommées dans le monde (Hammes <i>et al.</i> , 2005).	6
Figure 2 : Répartition des macro- et micro- nutriments dans les tissus du grain de blé (Saulnier, 2012)..	8
Figure 3 : Morphologie de différents grains de céréales (Saulnier, 2012)..	9
Figure 4 : Exemples de starters amylolytiques pour la préparation de vin de riz : <i>ragi</i>	13
Figure 5 : Schéma de la production du pain à partir de la fermentation de pâte (Hammes <i>et al.</i> , 2005)..	14
Figure 6 : Exemples d'aliments et de boissons fermentés à base de céréales (Guyot, 2010; Tamang, 2010c ; d)..	15
Figure 7 : Formes typiques du <i>matmor</i> (Bartali, 1987)..	19
Figure 8 : Blé fermenté (A) et ouverture du <i>matmor</i> (B) (Bekhouche <i>et al.</i> , 2013).	19
Figure 9 : Principales voies cataboliques du glucose par les BL (Endo and Dicks, 2014).	22
Figure 10 : Schéma d'un arbre phylogénétique, sans racines, des BL (Axelsson, 2005).	24
Figure 11 : Représentation schématique du principe de la TTGE (Macé, 2013).	29
Figure 12 : Principe de la méthode Terminal restriction fragment length polymorphism -T-RFLP, adaptée de Kaksonen (2014)..	32
Figure 13 : Métabolisme de l'amidon et la conversion des maltodextrines dans les pâtes au levain (Nakai <i>et al.</i> , 2009; Gänzle and Follador, 2012; Gänzle, 2014)..	37
Figure 14 : (a) Hydrolyse des granules d'amidon de blé par <i>L. plantarum</i> A6, (b) micrographie électronique à balayage montrant l'effet de l' α - amylase produite par <i>L. plantarum</i> LPCR2-3 sur les granules d'amidon du maïs après fermentation (Guyot, 2010, 2012)..	39
Figure 15 : Vue d'ensemble sur la protéolyse des protéines (Gänzle, 2014).	40
Figure 16 : Conversion des acides gras (Gänzle, 2014)..	40
Figure 17 : Conversion des acides aminés ; voies de formation des composés aromatiques (Ardö, 2006). Exemples de la thréonine, de la méthionine et de l'acide aspartique.	44
Figure 18 : Matière première et additifs utilisés.	49
Figure 19 : Matériel utilisé dans la fermentation.	49

Figure 20 : Conditions de la fermentation.....	51
Figure 21 : Traitement du blé après la fermentation	51
Figure 22 : Mise en place de la fermentation du blé dans les jerrycans en plastique.	53
Figure 23 : Effet graduel de la fermentation après 3 mois.....	55
Figure 24 : Aspect macroscopique du blé après 12 mois de fermentation.....	55
Figure 25 : Echantillons de blé fermenté (mélange) durant 3, 6, 9, 12 et 24 mois.	57
Figure 26 : Aspects macroscopiques des colonies sur les 3 milieux : a ; MRS acidifié, b ; MRS et c ; BHIYE (cultures de 72 h à 30°C).	64
Figure 27 : Exemple de gel de la PCR multiplexe avec les amorces SCAR espèces-spécifiques.....	85
Figure 28 : Gel de la PCR espèce- spécifique de <i>Leu. mesenteroides</i>	85
Figure 29 : Les lactobacilles isolés à partir des différents stades de fermentation, obtenus par microscopie à contraste de phase (échelle ; 10µm).....	88
Figure 30 : Les lactocoques isolés à partir des différents stades de fermentation, obtenus par microscopie à contraste de phase (échelle ; 10µm).....	89
Figure 31 : TTGE des fragments de la région V3 du gène de l'ARNr 16S des échantillons de blé fermenté V et E durant 24 mois.....	90
Figure 32 : Exemples de profils RAPD : (A) avec le primer 1 et (B) avec le primer 5.....	92
Figure 33 : Exemples de profils REA-PFGE : (A) <i>E. faecium</i> (B) <i>Lactobacillus</i> spp. et (C) <i>Pediococcus</i> spp.	92
Figure 34 : Dendrogrammes de similarité des profils RAPD de : <i>E. faecium</i> , <i>Pediococcus</i> spp., et <i>Lactobacillus</i> spp., isolées à partir de blé fermenté des échantillons E et V en utilisant le primer 1 (a) et le primer 5 (b). Les similarités des profils sont calculées en utilisant le coefficient de Dice et les dendrogrammes sont obtenus par l'algorithme de clustering UPGMA	94
Figure 35 : Dendrogrammes de similarité des profils REA-PFGE de : <i>E. faecium</i> (a), <i>Pediococcus</i> spp., (b) et <i>Lactobacillus</i> spp., (c), isolés à partir des échantillons E et V.	95
Figure 36 : Taux des acides aminés libres sur la base de la matière sèche.	108
Figure 37 : Cartes des facteurs individuels (A) et variables (B) de l'analyse en composantes principales des acides aminés libres dans le blé fermenté avec vinaigre (V) et sans vinaigre (E) pendant 3, 6, 9, 12 et 24 mois	114
Figure 38 : Chromatogrammes des 11 échantillons analysés par la CPG/SM.....	116

Figure 39 : Abondances, au cours de la fermentation, des alcools et des aldéhydes identifiés par CPG/SM.	117
Figure 40 : Abondances, au cours de la fermentation, des acides organiques identifiés par CPG/SM.	118
Figure 41 : Abondances, au cours de la fermentation, des composés soufrés et aromatiques identifiés par CPG/SM.	119
Figure 42: Cartes des facteurs individuels (A) et variables (B) de l'analyse en composantes principales de 40 composés aromatiques volatils, produits dans le blé fermenté avec vinaigre (V) et sans vinaigre (E) pendant 3, 6, 9, 12 et 24 mois.	120

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Composition en nutriments et répartition des tissus des grains de quelques céréales (Saulnier, 2012).	8
Tableau 2: Starters amylolytiques mixtes dans les pays asiatiques (Tamang, 2010c).	11
Tableau 3 : Aliments et boisson traditionnels, à base de céréales fermentées(Guyot, 2010). ...	17
Tableau 4 : Différentes caractéristiques des BL (Axelsson, 2005).	20
Tableau 5 : Avantages et limites de l'utilisation techniques moléculaires (Cocolin and Ercolini, 2008).	35
Tableau 6 : Effectif des personnes questionnées	48
Tableau 7 : Dénombrements des champignons filamenteux et des levures dans les échantillons E et V exprimés en log UFC g ⁻¹	61
Tableau 8 : Description des différentes colonies fongiques isolées.	62
Tableau 9 : Champignons filamenteux isolés du blé avant et après fermentation	65
Tableau 10 : Dénombrements de la flore lactique, mésophile aéro/anérobies, des échantillons E et V exprimés en log UFCg ⁻¹	64
Tableau 11: Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des 69 isolats sélectionnés.	66
Tableau 12: Composition du milieu réactionnel de la PCR de l'ADNr 16S par la paire d'amorces universelle.	73
Tableau 13: Composition du milieu réactionnel de la PCR des gènes de ménage <i>pheS</i> et <i>rpoA</i>	75

Tableau 14: Milieu réactionnel de la PCR espèce-spécifique de <i>Leu. mesenteroides</i>	74
Tableau 15: Composition du milieu réactionnel de la PCR multiplexe de <i>Pediococcus. spp.</i> ,	74
Tableau 16: Composition du milieu réactionnel de la PCR-RAPD.....	77
Tableau 17: Paramètres de migration de la PFGE	81
Tableau 18: Composition du milieu réactionnel de la PCR-TTGE.	83
Tableau 19 : Identification des 69 BL isolées des échantillons E et V.....	87
Tableau 20 : Les valeurs <i>P</i> de l'ANOVA montrant l'effet du temps et de l'ajout de vinaigre sur les différents paramètres physico-chimiques.	107
Tableau 21 : Teneurs en acides aminés dans le blé non-fermenté et leurs pourcentages en forme libre dans les échantillons E et V après 24 mois de fermentation.	109
Tableau 22 : Les valeurs <i>P</i> de l'ANOVA montrant l'effet du temps et de l'ajout de vinaigre sur la quantité des acides aminés libres.....	112
Tableau 23: Composés volatils identifiés, ion (m/z) de quantification, et les valeurs <i>P</i> de l'ANOVA, montrant l'effet du temps et de l'ajout de vinaigre sur leurs quantités.	115
Tableau 24 : Activités hydrolytiques de <i>Lactobacillus</i> spp.,	122
Tableau 25 : Activités hydrolytiques de <i>Pédiococcus</i> spp.,.....	124
Tableau 26 : Activités hydrolytiques d' <i>Enterococcus</i> spp.,	125
Tableau 27 : Activités hydrolytiques des <i>Leuconostoc</i> spp., et de <i>W. paramesenteroides</i> ...	125

INTRODUCTION GENERALE

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 anti-nutritionnels. Leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles sont également améliorées (Tamang, 2010a). Les aliments fermentés sont la base de l'alimentation de nombreuses populations, en particulier dans les pays en voie de développement et émergents, où la fermentation est souvent la seule façon de préserver les aliments contre les microorganismes d'altération (Humblot and Guyot, 2008). Ils participent également à l'identité culturelle, car ils sont souvent liés à de très anciennes habitudes et pratiques alimentaires traditionnelles (Guyot, 2012).

Les aliments fermentés conventionnels, largement produits dans le monde occidental (produits laitiers, levain, viande et vin), ont reçu une attention scientifique significative liée à l'existence d'un puissant marché économique. Ce qui n'est pas le cas dans les pays en voie de développement, particulièrement en Afrique, où la préparation de nombreux aliments fermentés locaux reste encore un savoir faire spécifique à chaque population. Ils sont souvent produits au sein des ménages dans les villages ou dans des industries de type artisanal (Motarjemi, 2002; Guyot, 2012).

Les produits fermentés à base de céréales présentent actuellement un intérêt scientifique particulier, car ils contribuent aux apports énergétiques et nutritionnels des populations. Ils sont élaborés à partir d'une variété de céréales donnant naissance à une grande diversité d'aliments à travers le monde. Le pain et les boissons alcoolisées sont les produits fermentés les plus anciens connus par l'humanité. Les grains de céréales comme le sorgho, le maïs et le millet sont des substrats courants dans la production de bouillies et de boissons fermentées d'origine africaine et américaine (Ben Omar and Ampe, 2000; Mugula *et al.*, 2001; Tou *et al.*, 2006; Abriouel *et al.*, 2006; Adebolu *et al.*, 2007). En Asie, la fermentation du riz avec des starters mixtes a donné naissance à divers produits fermentés traditionnels (Hammes *et al.*, 2005; Tamang, 2010b).

Les céréales fermentées abritent divers microorganismes qui comprennent les bactéries lactiques (BL), les levures et les champignons filamenteux. La composition et la diversité du microbiote des céréales fermentées dépendent de l'environnement et de l'adaptation des microorganismes aux conditions de la fermentation. La plupart de ces fermentations comportent une phase dominée par les BL, qui peut être associée à une autre

étape de fermentation alcoolique par les levures. Les champignons filamenteux sont relativement limités ; ils sont présents dans certains produits et boissons fermentées d'origines asiatiques (Jespersen, 2003; Guyot, 2010; Tamang, 2010c).

Divers composés sont formés à partir de l'hydrolyse des composants des céréales (amidon, protéines et lipides), par des enzymes d'origine endogène et microbienne. En fonction de la structure chimique et la production des métabolites générés par ces activités enzymatiques, le goût, la texture, la consistance et les propriétés fonctionnels des produits sont affectés (Kamal-Eldin, 2012a). La plupart des travaux sur les aliments à base de céréales fermentées sont consacrées à la caractérisation des communautés microbiennes impliquées et à leur interaction avec la matrice. Le but est d'acquérir les connaissances nécessaires pour améliorer leur qualité et attractivité, garantir leur sécurité, et permettre leur production à plus grande échelle.

En Algérie, le blé dur fermenté *lemzeiet* est utilisé pour la fabrication du couscous appelé aussi *lemzeiet* ; historiquement obtenu après le stockage des grains de blé dur, plusieurs années, dans des silos souterrains (*matmor*). Suite à l'infiltration des eaux de pluie à l'intérieur du *matmor*, le blé inondé ou humidifié avec une fermentation spontanée offre des nouvelles fonctionnalités par la production de saveurs typiques ainsi que des changements de texture et de couleur. Traditionnellement la fermentation du blé est réalisée à l'intérieur du *matmor*, actuellement elle est effectuée à l'extérieur selon un nouveau procédé rapide, non contrôlé, dans des ustensiles de différentes formes et tailles. L'ancien procédé a été progressivement abandonné en raison de l'exode rural et l'extension des méthodes modernes de stockage du blé (Bekhouche *et al.*, 2013).

À notre connaissance, il n'existe aucune étude sur blé fermenté à l'extérieur du *matmor* ni aucun guide de bonne pratique de fabrication, nécessaire à la commercialisation d'un produit de qualité satisfaisante tant sur le plan sanitaire qu'organoleptique.

Afin de caractériser ce nouveau procédé et dans une approche de valorisation, nous avons ciblé plusieurs objectifs dans ce travail : reproduire le procédé de fermentation, évaluer la qualité de la flore microbienne présente (bactéries lactiques, levures, moisissures), suivre son évolution au cours de la fermentation, et déterminer l'impact de la fermentation sur les modifications physico-chimiques de la matrice du blé fermenté.

Notre travail débutera par une étude bibliographique présentant les connaissances actuelles pour situer le contexte socio-économique et scientifique dans lequel s'inscrit le sujet. Cette revue bibliographique comprend quatre parties. La première partie décrit la place de la fermentation dans l'élaboration d'aliments à base de céréales. La deuxième et la troisième partie sont consacrées, respectivement, au microbiote des aliments fermentés à base de céréales et aux méthodes moléculaires de caractérisation des communautés microbiennes dans les différentes matrices alimentaires. Enfin, la quatrième partie aborde les modifications physico-chimiques durant la fermentation des céréales.

La partie expérimentale de ce travail de thèse est présentée dans 4 chapitres :

- le chapitre 1 est consacrée à l'enquête et à la reproduction expérimentale du nouveau procédé de fermentation ;
- le chapitre 2 concerne la description du microbiote du blé fermenté et l'évaluation de sa qualité fongique par les méthodes culturales et de dénombrement classiques;
- le chapitre 3 comporte la caractérisation moléculaire des BL isolées et leurs dynamiques au cours de la fermentation, grâce à une approche combinant des méthodes culture-dépendantes et indépendantes ;
- le chapitre 4 traite l'effet de l'activité des BL sur les modifications de la matrice du blé fermenté. Il est consacré aux analyses physico-chimiques des différents paramètres du blé fermenté, ainsi que la détermination des profils des acides aminés libres et des molécules volatiles par l'utilisation, respective, de la chromatographie échangeuse d'ion et de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). Le profil enzymatique des espèces isolées est également déterminé.

Enfin, ce document comporte une conclusion générale et un exposé 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 starters.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Règne	<i>Eucarya</i>											
Sous-règne	<i>Chlorobionta</i>											
Embranchement	<i>Streptophyta</i>											
Sous-Embranchement	<i>Streptophytina</i>											
Classe	<i>Magnoliopsida</i>											
Sous-classe	<i>Liliidae</i> (monocotylédones)											
Ordre	<i>Poales</i> Céréales											
Famille	<i>Poaceae</i> (Gramineae)											
Sous-famille	<i>Poideae</i>				<i>Oryzoideae</i>		<i>Panicoideae</i>				<i>Chloroideae</i>	
Genre	<i>Triticum</i>	<i>Secale</i>	<i>Hordeum</i>	<i>Avena</i>	<i>Oryza</i>	<i>Zea</i>	<i>Sorghum</i>	<i>Pennisetum</i>	<i>Setaria</i>	<i>Panicum</i>	<i>Eragrostis</i>	<i>Elausine</i>
Espèces	<i>durum</i>	<i>cereale</i>	<i>vulgare</i>	<i>sativa</i>	<i>sativa</i>	<i>mays</i>	<i>bicolor</i>	<i>glaucum</i>	<i>italica</i>	<i>miliaceum</i>	<i>teff</i>	<i>coracana</i>
	<i>turgidum</i>											
	<i>aestivum</i>											
	<i>spelta</i>											
	blé	seigle	orge	avoine	riz	maïs	sorgho	millet perle	millet commun	millet des oiseaux	teff	éleusine

Ordre	<i>Caryophyllales/Polygonales</i>		
Famille	<i>Amaranthaceae:</i>	<i>Amaranthus paniculatus</i>	amaranthe
Famille	<i>Chenopodiaceae:</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>	quinoa
Famille	<i>Poligonaceae:</i>	<i>Fagopyrum esculentum</i>	sarrasin
<i>Rosidae</i>	(dicotylédones)		

Figure 1: Relation phylogénétique entre les céréales et les pseudo-céréales produites et consommées dans le monde (Hammes *et al.*, 2005).

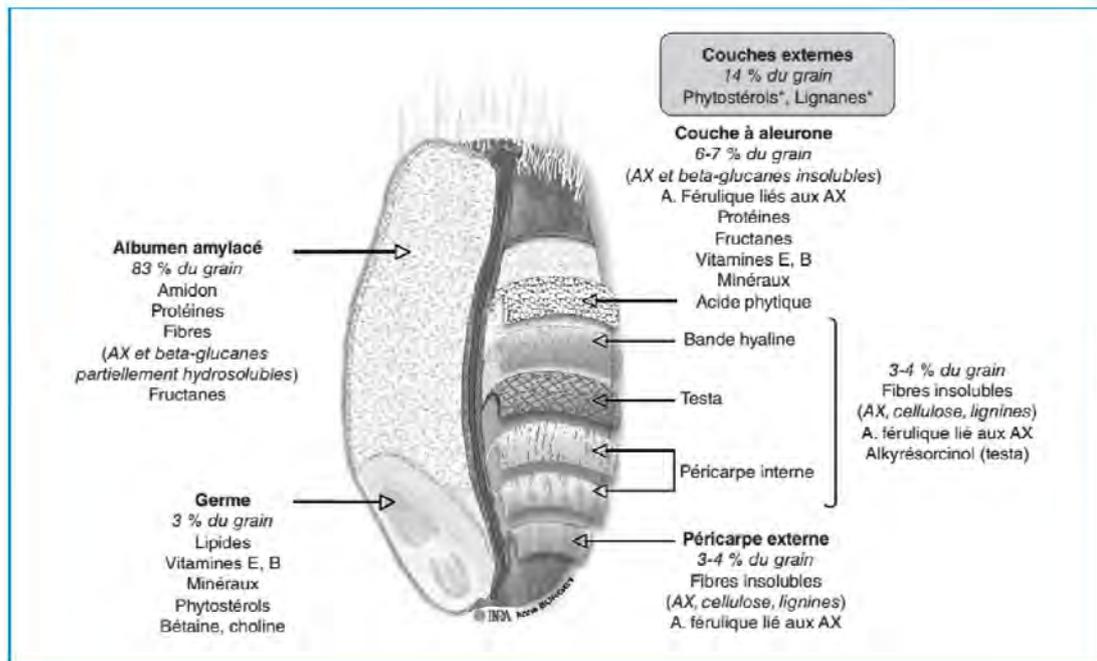
1. CEREALES ET FERMENTATION

1.1 Céréales

Dans le monde, la production des céréales est estimée à 2532 millions de tonnes en 2014. A partir de l'année 1980, leur consommation dans les pays en voie de développement a dépassé celle des pays développés et représente maintenant 61% de la consommation mondiale ; elles sont les principaux aliments de base dans ces contrées ou dans les régions moins développées économiquement (FAO, 2014). En Algérie, au Maroc et en Tunisie, les produits à base de céréales représentent une part importante des dépenses alimentaires des ménages. Le blé dur demeure la base de l'alimentation au Maghreb ; il est le support historique et traditionnel de l'alimentation des maghrébins (Rastoin and Benabderrazik, 2014). Ceci est dû à la variété des produits consommés, à base de semoule de blé dur, comme le couscous, les pâtes, le pain, la galette (*Kisra*) et les pâtisseries (Kezih *et al.*, 2014).

Les variétés de céréales les plus consommées dans le monde sont : le blé dur (*Triticum sativum*), le maïs (*Zea mays*), le riz (*Oryza sativa*), le seigle (*Secale cereale*), l'orge (*Hordeum vulgare*), l'avoine (*Avena sativa*), le sorgho (*Sorghum bicolor*), le millet (*Pennisetum glaucum*), et le teff (*Eragrostis tef*). Leur importance varie selon les régions géographiques où elles sont naturellement cultivées. La position phylogénétique et les rapports entre les céréales sont représentés dans la figure (1), qui comprend également les pseudo- céréales. Ce sont des plantes dicotylédones, qui ne sont pas étroitement liées entre elles ou aux véritables céréales monocotylédones. Leur nom vient de leur production de petites graines comme celles des céréales. Elles comprennent trois cultures : l'amarante (*Amaranthus sp. Amaranthaceae*), le quinoa (*Chenopodium quinoa*, *Chenopodiaceae*) et le sarrasin (*Fagopyrum esculentum*, *Polygonaceae*) (Belton and Taylor, 2002). La composition des pseudo- céréales est similaire à celle des céréales, notamment en ce qui concerne la teneur en amidon (Hammes *et al.*, 2005).

Les grains des différentes espèces de céréales montrent une certaine diversité de forme et de taille et, à l'exception du maïs et du riz, sont caractérisés par un sillon plus ou moins prononcé (blé, orge, avoine, seigle, triticales, etc.) (figure 2). En général, ils sont débarrassés des parties florales (ou « glumelles ») à la récolte sauf dans le cas de l'orge et de l'avoine où les grains sont « nus » ou « vêtus » selon les variétés (Saulnier, 2012).



(*) Localisation non déterminée précisément dans les couches externes.

Figure 2: Répartition des macro- et micro- nutriments dans les tissus du grain de blé (Saulnier, 2012).

Tableau 1: Composition en nutriments et répartition des tissus des grains de quelques céréales (Saulnier, 2012).

Matière sèche du grain (%)	Blé	Maïs	Riz brun
Amidon	69	72	73
	63-72	61-78	-
Protéines	12,7	10	8
	9-16	6-12	7-9
Fibres	14	9,6	3,5
	11,5-18,3	8,3-11,9	2,9-3,9
Lipides	2,4	4,3	2,9
	2,5-3,3	3,1-5,7	1,6-2,8
Sucres réducteurs	2,4	2,6	0,9
	1,0-4,0	1,0-3,0	-
Cendres	1,9	1,4	1,5
	-	1,1-3,9	1,0-1,5
Germe	3	11,5	3
Albumen amylicé	83,2	83,5	90-91
Enveloppes externes	13,7	6	5-7
Couches aleurone	6,5	-	4-6*
Couches hyaline+ testa + péricarpe interne	3,5	-	-
Péricarpe externe	3,8	-	1-2

*aleurone + couche hyaline + testa

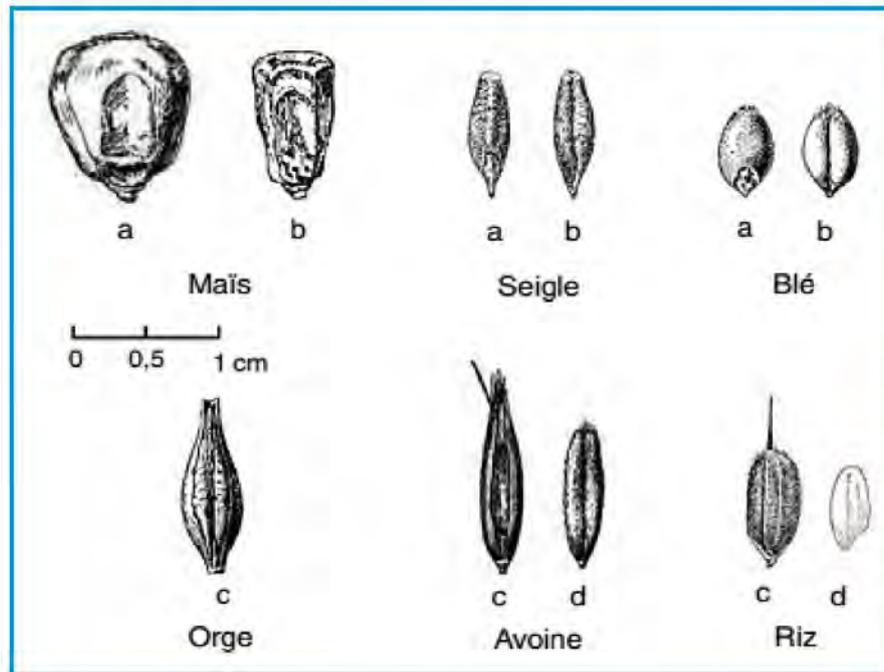


Figure 3: Morphologie de différents grains de céréales. a : vue dorsale, b : vue ventrale ; c : grain vêtu, d : grain nu (Saulnier, 2012).

La constitution histologique d'un grain de céréales et la composition des différents tissus sont illustrées dans le cas du blé dans la figure (3). Le grain de blé est composé de nombreux tissus morphologiquement différents. La transformation technologique des céréales consiste à fragmenter le grain en particules plus ou moins fines (farine, semoules, etc.) et l'élimination partiellement ou totale des tissus les plus externes. En conséquence, les farines et semoules obtenues seront en général enrichies en amidon et en protéines mais appauvries en fibres, vitamines et minéraux par rapport aux grains entiers (tableau 1).

Les grains de céréales contiennent des composés bioactifs uniques qui complètent ceux des fruits et des légumes lorsqu'ils sont consommés ensemble. Les principaux composés bioactifs sont les composés phénoliques, les phytostérols, les tocots, les fibres alimentaires (principalement les bêta -glucanes), les lignanes, les alkylrésorcinols, l'acide phytique, le γ - oryzanols, les avenanthramides, l'acide cinnamique, l'acide férulique, l'inositol et la bêtaïne. Quelques composés bioactifs sont très spécifiques à certaines céréales comme le γ -oryzanol dans le riz, les avenanthramides et les saponines dans l'avoine, les bêta-glucanes dans l'avoine et l'orge et les alkylrésorcinol dans le seigle. Ces composés actifs sont également présents dans d'autres céréales comme le blé, mais à des quantités relativement moins importantes (Gani *et al.*, 2012)

1.2 Catégories et technologies de la fermentation des céréales

La plus grande partie des aliments à base de céréales est soumise à des processus de fermentation, qui ont lieu, au moins à une étape de leur élaboration. Les céréales ; le blé, le seigle, le riz, le maïs, l'orge, l'avoine, le sorgho et le millet sont fermentées en divers produits dans différentes régions du monde. Ils existent trois modèles de fermentation des céréales réalisés en milieux solide, liquide et semi-solide avec ajout préalable ou non de starter. Les produits fermentés qui en résultent sont généralement classés en trois catégories: pain ou pâte au levain, bouillies et boissons (alcoolisées et non alcoolisées) (Blandino *et al.*, 2003; Tamang, 2010c):

- en milieu solide, la matière première (état solide) est le seul ingrédient dans le milieu ;
- en milieu liquide, la matière première est immergée dans l'eau ;
- en milieu semi-solide, la matière première est simplement humidifiée.

Les activités hydrolytiques du grain et des microorganismes contaminants sont l'origine de toutes les fermentations des céréales. En présence d'eau, ces microorganismes sont métaboliquement actifs et les organismes les plus compétitifs dominent le processus (BL et levures). La gestion des activités hydrolytiques nécessaires pour obtenir les glucides fermentescibles, nécessite des technologies traditionnelles spécifiques qui ont évolué dans l'histoire. Quatre technologies de base existent dont l'importance varie selon les régions à travers le monde (Hammes *et al.*, 2005) :

- le maltage (activités endogènes non microbiennes) ;
- l'utilisation de starters mixtes d'origine ethnique ;
- les pâtes fermentées (pâte au levain ou bouillie) ;
- l'utilisation des activités enzymatiques externes (exemple de la *Chicha*).

1.2.1 Maltage

Le maltage est l'opération de base dans la production des boissons alcoolisées. Il consiste à reproduire, de façon industrielle ou artisanale, le développement naturel d'une céréale, généralement de l'orge bien que d'autres céréales s'y prêtent également (seigle, sorgho et maïs). Le principe du maltage consiste à reproduire les conditions idéales de développement du grain (chaleur et humidité) afin qu'il produise les enzymes nécessaires à la saccharification de l'amidon, et donc, la libération de sucres fermentescibles menant à la

Tableau 2: Starters amylolytiques mixtes dans les pays asiatiques (Tamang, 2010c).

Nom du starter	Substrat	Apparence	Nom du produit	Micoorganismes impliqués	Pays d'origine	Statut
<i>Balan</i>	Blé	Sec, boule	Boisson alocoolisée	Champignons filamenteux , levures	Inde	Fait maison
<i>Bakhar</i>	Riz, herbes	Sec, boule	Boisson alocoolisée	Levures	Inde	Fait maison
<i>Bubod</i>	Riz, herbes sauvages	Sec, mélange de starter	<i>Basi</i>	Champignons filamenteux , levures, BL	Philippines	Fait maison
<i>Chiu-yueh</i>	Riz, herbes sauvages	Sec, boule, blanc à gris	<i>Lao-chao</i>	Champignons filamenteux , levures, BL	Chine, Taïwan, Singapour	Fait maison
<i>Chou.or.chu</i>	Blé, riz, sorgho ou orge	Sec, gateaux, boule	Boisson alocoolisée, vinaigre	Champignons filamenteux , acetobacter, BL	Chine	Fait maison
<i>Chuzo</i>	Riz, herbes sauvages	Sec, boule	Boisson alocoolisée	Champignons filamenteux , levures, BL	Mongolie	Fait maison
<i>Dhehli</i>	Orge, 36 plantes sauvages	Sec, forme de brique	<i>Sura</i>	Champignons filamenteux , levures	Inde	Fait maison
<i>Emao</i>	Riz, herbes	Mélange	Boisson alocoolisée	Champignons filamenteux , levures	Inde	Fait maison
<i>Hamei</i>	Riz, herbes sauvages	Sec, mélange de starter	<i>Atingbai</i>	Champignons filamenteux , levures, BL	Inde	Fait maison
<i>Ipoh/siye</i>	Riz, herbes sauvages	Sec, mélange de starter	Boisson alocoolisée	Champignons filamenteux , levures, BL	Inde	Fait maison
<i>Jui paing</i>	Riz, herbes sauvages	Sec, boule	<i>Tapai</i>	Champignons filamenteux , levures, BL	Malaisie	Fait maison
<i>Loogpang</i>	Riz, herbes sauvages	Sec, mélange de starter	<i>Khao-maak,krachae,nam khao,ou,sato</i>	Champignons filamenteux , levures, BL	Thaïlande	Fait maison
<i>Khekhrii</i>	Riz germé	Sec, mélange de starter	<i>Zutho</i>	Levures, BL	Inde	Fait maison
<i>Koji</i>	Riz, blé	Sec, noir-jaune, culture de moisissures	<i>Saké, miso,shoyu</i>	<i>Aspergillus oryzae , A. sojae</i> , levures	Japon	Industrialisé
<i>Marcha</i>	Riz, herbes sauvages, épices	Sec, mélange de starter	<i>Kodo ko jaanr, bhaati, jaanr, gahoon ko jaanr</i>	Champignons filamenteux , levures, BL	Népal	Fait maison
<i>Mana</i>	Blé,herbes	Sec, starter granulé	Boisson alocoolisée	<i>A. oryzae</i>	Népal	Fait maison
<i>Manapu</i>	Riz, blé, herbes	Sec, mélange de starter	<i>Poko</i>	Champignons filamenteux , levures	Népal	Fait maison
<i>Men</i>	Riz, herbes sauvages, épices	Sec, boule	<i>Ruou</i>	Champignons filamenteux , levures, BL	Viêt Nam	Fait maison
<i>Nuruk</i>	Riz, herbes sauvages	Sec, mélange de starter	<i>Takju, sojo, yakju</i>	Champignons filamenteux , levures, BL	Corée	Industrialisé
<i>Phab</i>	Riz, herbes sauvages	Sec, mélange de starter	<i>Chyang</i>	Champignons filamenteux , levures, BL	Inde, Chine, Bhoutan, Népal	Fait maison
<i>Pham</i>	Riz, herbes	Sec, mélange de starter	Boisson alocoolisée	Champignons filamenteux , levures,	Inde	Fait maison
<i>Ragi</i>	Riz, herbes sauvages	Sec, mélange de starter	<i>Tapé</i>	Champignons filamenteux , levures, BL	Indonésie	Fait maison
<i>Thiat</i>	Riz, herbes	Sec, mélange de starter	<i>Kiad-lieh</i>	Champignons filamenteux , levures, BL	Inde	Fait maison

production de l'alcool. Dans de tels procédés, une fermentation alcoolique se développe spontanément par les levures (principalement *Saccharomyces cerevisiae*) associées aux BL, qui sont responsables du goût aigre de la bière (Jespersen, 2003; Maoura *et al.*, 2005).

1.2.2 Starters mixtes d'origine ethnique

Trois types de cultures ou inoculum mixtes sont traditionnellement utilisés comme starters pour convertir l'amidon des céréales en sucres fermentescibles. Les starters ont une spécificité ethnique et culturelle. Ils ont des noms vernaculaires et représentent trois catégories (Fleet, 1997; Tamang and Fleet, 2009; Tamang, 2010c) (tableau 2) :

- **La 1^{ère} catégorie**, est une association de champignons filamenteux amylolytiques, de levures productrices d'alcools, de BL acidifiantes et de substrat de base (riz ou blé). Ils sont sous forme de boules sèches, aplaties ou rondes et de différentes tailles (figure 4). Le substrat est inoculé avec un starter précédent. La flore mixte de la boule sèche se développe pour une courte période, puis séchée et utilisée pour la production de l'alcool ou des aliments fermentés à partir de céréales.
- **La 2^{ème} catégorie**, c'est l'utilisation des activités physiologiques hydrolytiques des moisissures pour obtenir la saccharification de l'amidon. Cette technique appelée technologie du *koji* a évolué en Asie de l'Est. Le *koji* est une culture de moisissures, principalement du genre *Aspergillus*, préparée à base de céréales ou légumes cuites à la vapeur. Elle est utilisée pour produire une variété de produits alimentaires fermentés comme les sauces de soja, le *miso* et les vins à base de céréales (le *saké*).
- **La 3^{ème} catégorie**, est une combinaison de farine de blé entier et de flore associée (levures et moisissures) humidifiée et modelée en formes de gros gâteaux compacts. Les gâteaux sont incubés, pour sélectionner certains microorganismes souhaitables, puis utilisés pour inoculer des grandes masses de matière amyliacée. Ce type de starter est surtout utilisé en Chine pour la production d'alcool.



Figure 4: Exemples de starters amylolytiques pour la préparation de vin de riz : *ragi* (Indonésie) et *men* (Viêtname) (Tamang, 2010c).

1.2.3 Pâtes fermentées

Différents produits sont issus de la fermentation des pâtes ou des bouillies. Dans ce type de produit les microorganismes contaminants sont à l'origine de toutes les modifications apportées aux substrats. Leur fermentation est principalement dominée par les BL en association ou non avec la fermentation alcoolique des levures.

La pâte au levain traditionnel est préparée à partir d'un mélange de farine, d'eau et de pâte fermentée précédemment appelée levain, environ 20 à 25 % (v/v) (figure 5). Le levain est très sensible aux variations de la qualité de la farine, de l'eau, et des soins apportés. Ces exigences, associées à un temps de panification et de fermentation long, ont mené au délaissement du levain au profit de la levure. Ces levains traditionnels dit de *type I*, ont été remplacés par l'utilisation de la levure de boulanger dans le 20^{ème} siècle (Hammes *et al.*, 2005; Kamal-Eldin, 2012b). Actuellement, en occident, l'utilisation des levains traditionnels dans la fabrication du pain connaît une renaissance motivée par l'effet bénéfique du levain sur la saveur, la texture, la durée de vie et les propriétés nutritionnelles des produits de boulangerie (Gänzle *et al.*, 2007).

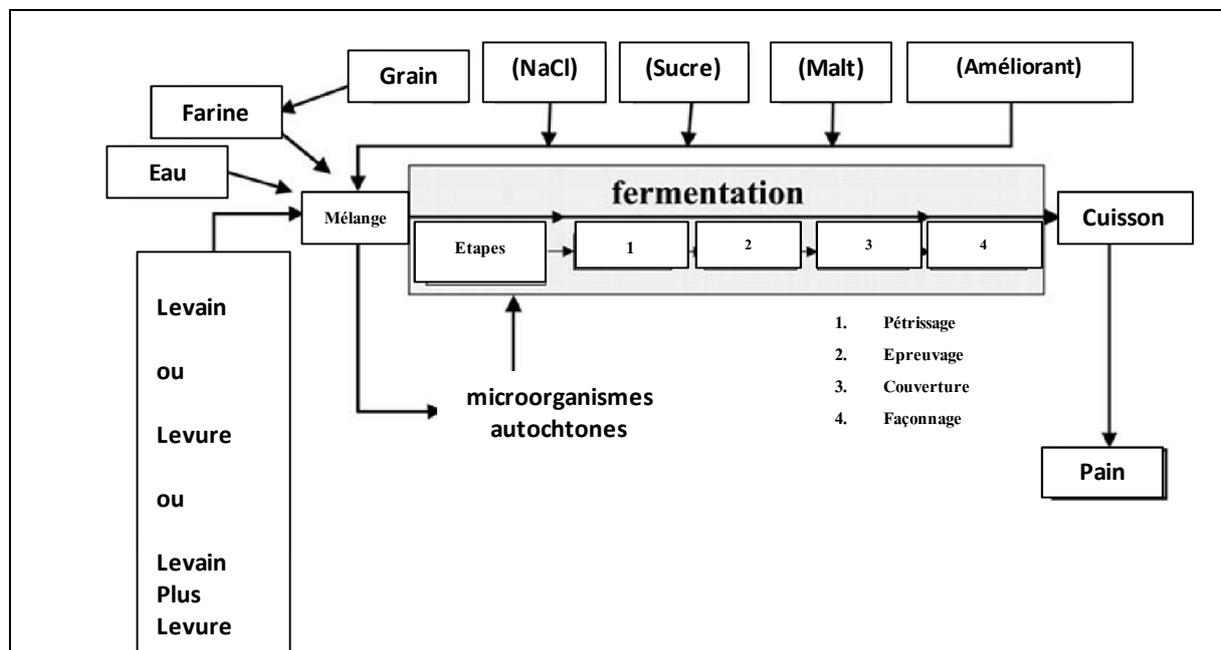


Figure 5 : Schéma de la production du pain à partir de la fermentation de pâte (Hammes *et al.*, 2005).

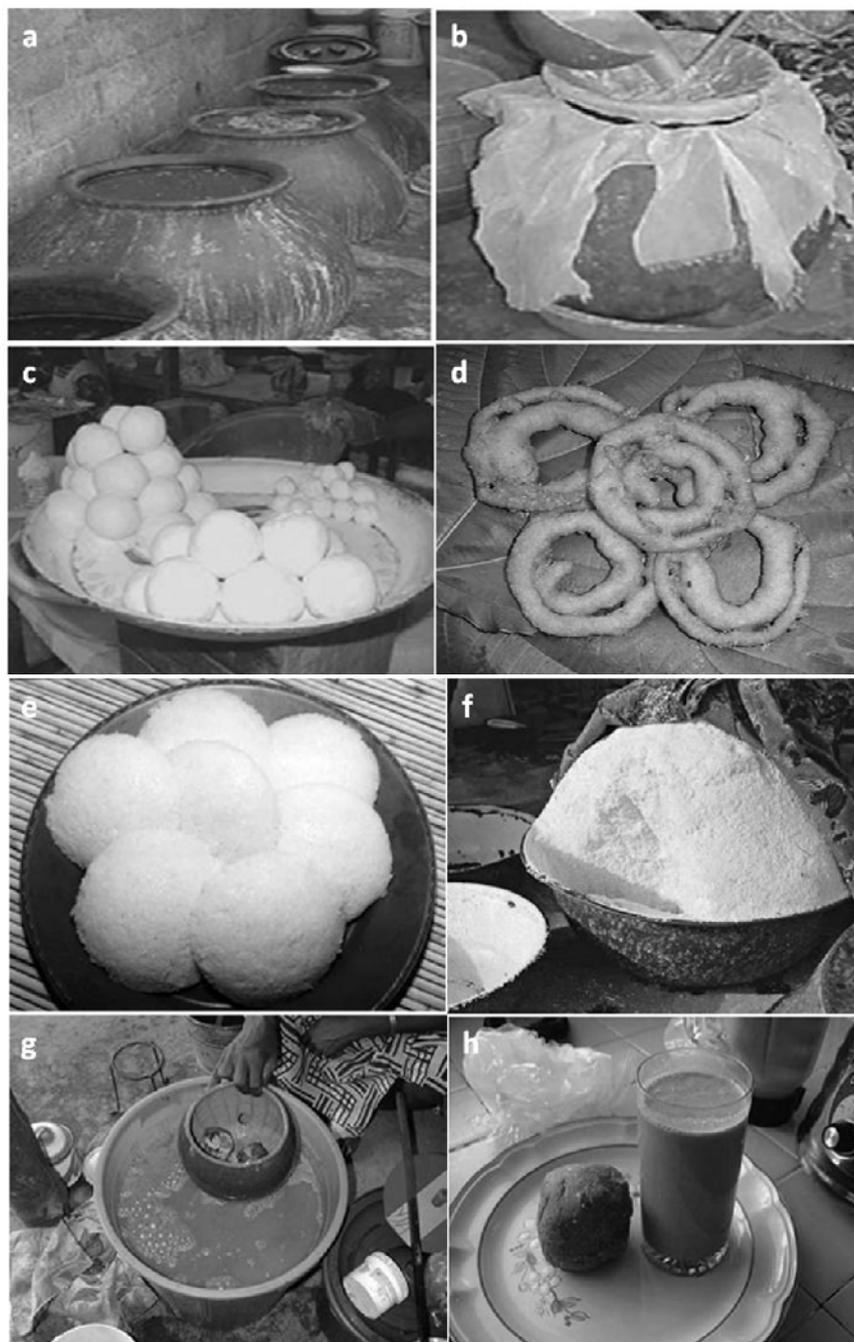


Figure 6: Exemples d'aliments et de boissons fermentés à base de céréales ; (a) *dolo* (Burkina Faso), (b) *ben-saalga* (Ouagadougou, Burkina Faso), (c) *poto poto* (Congo), (d) *selroti* (Inde, Népal), (e) *idli* (Inde), (f) *mawé* (Bénin), (g) *Tchoukoutou* et (h) *pozol* (Mexique) (Guyot, 2010; Tamang, 2010c; d).

1.2.4 Exemple d'enzymes hydrolytiques de sources externes la Chicha

L'utilisation des enzymes hydrolytiques provenant de sources externes est une pratique utilisée dans la production de la *Chicha* ; type unique de bière ethnique préparée par les indiens vivants dans les Andes en Amérique du Sud. La *Chicha* est préparée à partir de maïs, en faisant usage des amylases provenant de la salive humaine pour convertir l'amidon des céréales en sucres fermentescibles, mélangé avec de l'eau tiède et laissé fermenter pendant quelques jours pour produire une boisson légèrement alcoolisée (Todorov and Holzapfel, 2015).

1.3 Aliments et boissons fermentées à base de céréales

Les aliments et les boissons fermentées à base de céréales sont élaborés à partir d'une grande variété de céréales donnant naissance à une grande diversité de produits à travers le monde (figure 6, tableau 3). Dans cette diversité, les produits issus de différents types de céréales peuvent être désignés par le même nom et vice versa (Guyot, 2010).

Le pain est probablement le produit le plus ancien connu par l'humanité. Les peuples de Babylone, d'Egypte, de Grèce et de Rome utilisaient le pain dans le cadre de leur régime alimentaire bien avant la période de JC. Selon les habitudes culturelles, le pain est consommé en grande quantité sous différents types et formes. Les formes arrondies sont les plus anciennes, les plus diversifiées et les plus populaires dans le monde entier (Gänzle *et al.*, 2007). Les produits de panification et leurs techniques de production diffèrent largement à travers le monde. L'objectif de la fabrication du pain est de convertir des farines de céréales en des produits plus attrayants, agréables au goût, nutritifs et faciles à digérer. Il s'agit notamment de : (a) pains baguettes en Europe, (b) les *tortillas* faites de maïs et de blé dans les pays d'Amérique centrale, (c) la *pizza*, *focaccia*, *ciabatta* et *pita* en Italie et dans d'autres pays d'Europe du Sud, (d) pains croustillants ou pains polaires au seigle, orge et au blé dans les pays scandinaves, et (e) *baladi* et *kisra* dans les pays du Moyen-Orient et d'autres pains plats en Afrique du Nord. Ces pains aux levains sont caractérisés par leur volume, par leur douceur et élasticité ainsi qu'une bonne durée de vie et une bonne qualité microbiologique (Kamal-Eldin, 2012b).

Une large gamme de bouillies et de boissons non alcoolisées à base de sorgho, de millet et de maïs est produite en Afrique : *ogi* (Benin, Nigeria), *togwa* (Tanzania), *bushera* (Uganda), *ben-saalga/koko* (Burkina Faso, Ghana), *gowé* (Benin), *mawé* (Benin), *kenkey*

Tableau 3: Aliments et boisson traditionnels, à base de céréales fermentées, consommés dans différentes régions du monde (Guyot, 2010).

Nom du Produit	Pays d'origine	Céréale utilisée	Nature du produit fermenté	Utilisation
<i>Ben-saalga,koko</i>	Burkina Faso, Ghana	Millet de perle	Liquide	Bouillie
<i>Bhaati jaanr</i>	Inde, Népal	Riz	Riz glutineux saccharifié	Boisson alcoolisée (douce-acide)
<i>Boza</i>	Bulgarie, Roumanie, Turquie, Albanie	Blé, seigle, millet, maïs, etc	Liquide (avec cuisson)	Boisson
<i>Bushera</i>	Ouganda	Sorgho, millet	Suspension	Boisson
<i>Dosa</i>	Inde	Riz et haricot urd	Pâte à frire	Crêpes
<i>Gahun to jaanr</i>	Inde	Blé	Graines cuites	Boisson alcoolisée (douce-acide) obtenue après filtration des graines
<i>Gowé. (Sifamu)</i>	Bénin	Sorgho	Liquide (avec cuisson)	Boisson
<i>Hussuwa</i>	Soudan	Sorgho	Pâte	Pâte comme aliment
<i>Idli</i>	India	Riz et haricot urd	Pâte à frire	Gâteaux cuits à la vapeur
<i>Injera</i>	Ethiopie	Teff, sorgho,éleusine, maïs, orge	Pâte à frire	Pain plat
<i>kenkey</i>	Ghana	Maïs	Pâte	Pâte cuite à la vapeur
<i>Kisra</i>	Golf arabe, Soudan, Irak	Sorgho, millet de perle	Pâte épaisse à frire	Pain plat
<i>Kodo ko jaan r</i>	Inde, Népal	Eleusine	Graines cuites	Boisson alcoolisée, épaisse, légèrement acide obtenue après pressage des graines
<i>Mahewu</i>	Afrique du Sud, Zimbabwe	Maïs	Suspension	Boisson
<i>Mawè</i>	Bénin, Togo	Maïs	Pâte	Aliment de base prêt-à - servir
<i>Ogi</i>	Afrique de l'ouest	Maïs, millet, sorgho	Liquide	Aliment de base prêt-à - servir
<i>Poto poto</i>	Congo	Maïs	Liquide	Bouillie
<i>Pozol</i>	Mexique, Guatemala	Maïs	Pâte cuite avec le citron vert	Boisson
<i>Selroti</i>	Inde, Népal, Bhoutan	Riz	Pâte à frire	Beignet
<i>Togwa</i>	Afrique de l'est	Maïs	Bouillie	Boisson
<i>Ben-saalga</i>	Burkina Faso, Ghana	Millet	Bouillie	Aliment de base prêt-à - servir
<i>Pain</i>				
<i>SanFransisco</i>	Etats- Unis	Blé, seigle	Pâte	Pain
<i>Pain au levain</i>	Europe, Australie, Amérique	Blé, seigle	Pâte	Pain baguette

(Ghana), *hussuwa* (Sudan) et *poto poto* (République populaire du Congo) (Muyanja *et al.*, 2003; Tou *et al.*, 2006; Abriouel *et al.*, 2006; Adebolu *et al.*, 2007; Guyot, 2010). Leurs fermentations sont dominées par les BL, qui hydrolysent l'amidon, et les levures qui contribuent au développement de la saveur (Kamal-Eldin, 2012b).

De nombreux pays africains fabriquent les boissons alcoolisées à partir des céréales (après maltage). Ce sont des bières traditionnelles de consistance épaisse, appelées sous différents noms, tels que *dolo* au Burkina Faso, *bili bili* au Tchad, *burukutu* au Nigeria; *pito* au Ghana, et *kaffir* ; bière Bantous en Afrique du Sud. En Afrique, ces bières diffèrent du type occidental, elles sont souvent aigres, moins carbonées et ne contiennent pas de houblon. Elles sont consommées sous forme brute, y compris les substrats non-fermentés et les microorganismes (Blandino *et al.*, 2003; Jespersen, 2003; Guyot, 2010).

En Asie, la fermentation du riz avec des starters mixtes a donné naissance à une grande variété de produits traditionnels (Hammes *et al.*, 2005). Les bières de riz sont généralement préparées en Asie comme *takju* en Corée, *tapuy* aux Philippines, *brem bali* en Indonésie et *jaanr* en Inde. Le *saké* (vin de riz) est une boisson alcoolisée consommée, en particulier, au Japon et en Chine. Le *bouza*, bière traditionnelle issue de la fermentation du blé, est connue depuis l'époque des pharaons. Epaisse et aigre, elle est produite principalement en Egypte, en Turquie et dans certains pays d'Europe de l'Est (Blandino *et al.*, 2003).

Dans les Himalayas, quelques céréales sont traditionnellement fermentées en aliments comme *selroti*, *nan*, *jalebi*, *siddu*, *bhatarua*, et *seerain*. Elles sont aussi fermentées pour produire des boissons alcoolisées (Tamang, 2010d). Au Mexique et au Guatemala, le maïs est utilisé pour la production d' une boisson, non alcoolisée, dénommée *pozol* (Ben Omar and Ampe, 2000).

1.4 Blé fermenté en Algérie

En Algérie, le blé était historiquement conservé dans des silos souterrains appelés *matmor* (figure 7). Suite à l'infiltration accidentelle des eaux de précipitation dans le *matmor*, les grains de blé humidifiés ou inondés, en périphérie et en profondeur du silo, subissent une fermentation spontanée. La présence d'humidité, de température non contrôlée et l'absence d'air crée dans le *matmor*, engendrent les phénomènes de fermentation d'origine microbienne qui peuvent durer plusieurs années (\leq neuf années) (figure 8). Le goût du blé fermenté est alors découvert et entré dans les habitudes alimentaires pour la fabrication de pain de blé fermenté ou de couscous *lemzeiet*, *elmechroub* ou encore *hamoum* (Mokhtari, 2012). Ce blé est caractérisé par une variété de saveurs, de textures et d'aromes particuliers très convoités par les consommateurs des régions spécifiques (Bekhouché *et al.*, 2013).

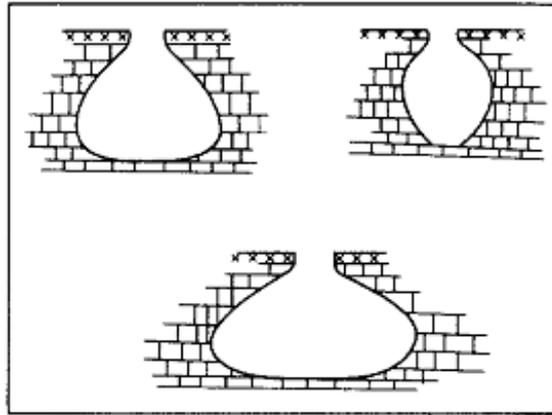


Figure 7: Formes typiques du *matmor* (Bartali, 1987).



Figure 8: Blé fermenté (A) et ouverture du *matmor* (B) (Bekhouché *et al.*, 2013).

Tableau 4: Différentes caractéristiques des BL (Axelsson, 2005).

Caractéristiques	Bâtonnets		Coques							
	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lactoc.</i> <i>Vagoc.</i>	<i>Leucon.</i> <i>Oenoc.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc.</i>	<i>Weissella</i> ^a
Formation de tétrade	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO ₂ ^b	- ^c	±	-	-	+	+	-	-	-	+
Croissance à 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Croissance à 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Croissance à 6,5% NaCl	ND ^d	±	+	+	-	±	±	-	+	+
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	+
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Acide lactique	L	D, L, DL ^f	L	L	L	D	L, DL ^f	L	L	D, DL ^f

+ , positif ; - , négatif ; , la réponse varie entre les espèces: ND , non déterminé.

^a Les souches de *Weissella* peuvent avoir la forme de bâtonnets.

^b Test pour l'homo- ou l'hétérofermentation du glucose: -, homofermentative: +, hétérofermentative.

^c Petite quantité de CO₂ peut être produite suivant le milieu utilisé.

^d Aucune croissance à 8% de NaCl n'a été rapportée.

^e Configuration de l'acide lactique produit à partir du glucose.

^f La production de D-, L-, ou DL- acide lactique varie entre les espèces.

2. MICROBIOTE DES ALIMENTS FERMENTES A BASE DE CEREALES

Les aliments fermentés, à base de céréales, abritent divers microorganismes (BL, levures et champignons filamenteux) présents sur les matrices de fermentation. La composition et la diversité du microbiote des céréales fermentées dépendent principalement de l'environnement (végétaux, animaux et ustensiles de fabrication, entres autres) et de l'adaptation des microorganismes aux conditions de fermentation (substrats, températures, pH, activité de l'eau) (Jespersen, 2003; Guyot, 2010; Tamang, 2010a).

2.1 Flore lactique et céréales fermentées

2.1.1 Propriétés et caractérisation des BL

Les BL sont un groupe de bactéries unies par une multitude de caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques. En général, elles sont décrites comme des bactéries à Gram positif, non mobiles, en forme de coques ou de bâtonnets, non sporulantes, dépourvues de cytochromes et de catalase, anaérobies micro-aérophiles, strictement fermentatives, aux exigences nutritionnelles complexes (acides aminés, peptides, vitamines, sels, acides gras, glucides fermentescibles) et qui produisent de l'acide lactique comme le principal produit final au cours de la fermentation des carbohydrates. Le terme de BL est intimement associé aux habitats riches en nutriments (lait, viande, végétaux) et aux aliments fermentés, mais d'autres sont aussi associées aux différentes surfaces des muqueuses des mammifères (Axelsson, 2005).

La classification des BL repose en grande partie sur la morphologie, l'arrangement, la croissance à des températures différentes, la configuration de l'acide lactique produit, la capacité de croître à des concentrations de sel élevées, et la tolérance acide ou alcaline (tableau 4). Les marqueurs chimiotaxonomiques, tels que les acides gras et les constituants de la paroi cellulaire (SDS-PAGE de toutes les protéines de la cellule), sont également utilisés dans la classification (Axelsson, 2005; Vandamme *et al.*, 2014).

Le mode de fermentation du glucose, en anaérobiose dans des conditions standards non limitatives en concentration de glucose et en facteurs de croissance (acides aminés, vitamines, et des précurseurs d'acides nucléiques), est une caractéristique importante utilisée dans la différenciation des genres des BL. Dans ces conditions les BL peuvent être divisées en deux grands groupes : les homofermentaires et les hétérofermentaires. La glycolyse (voie

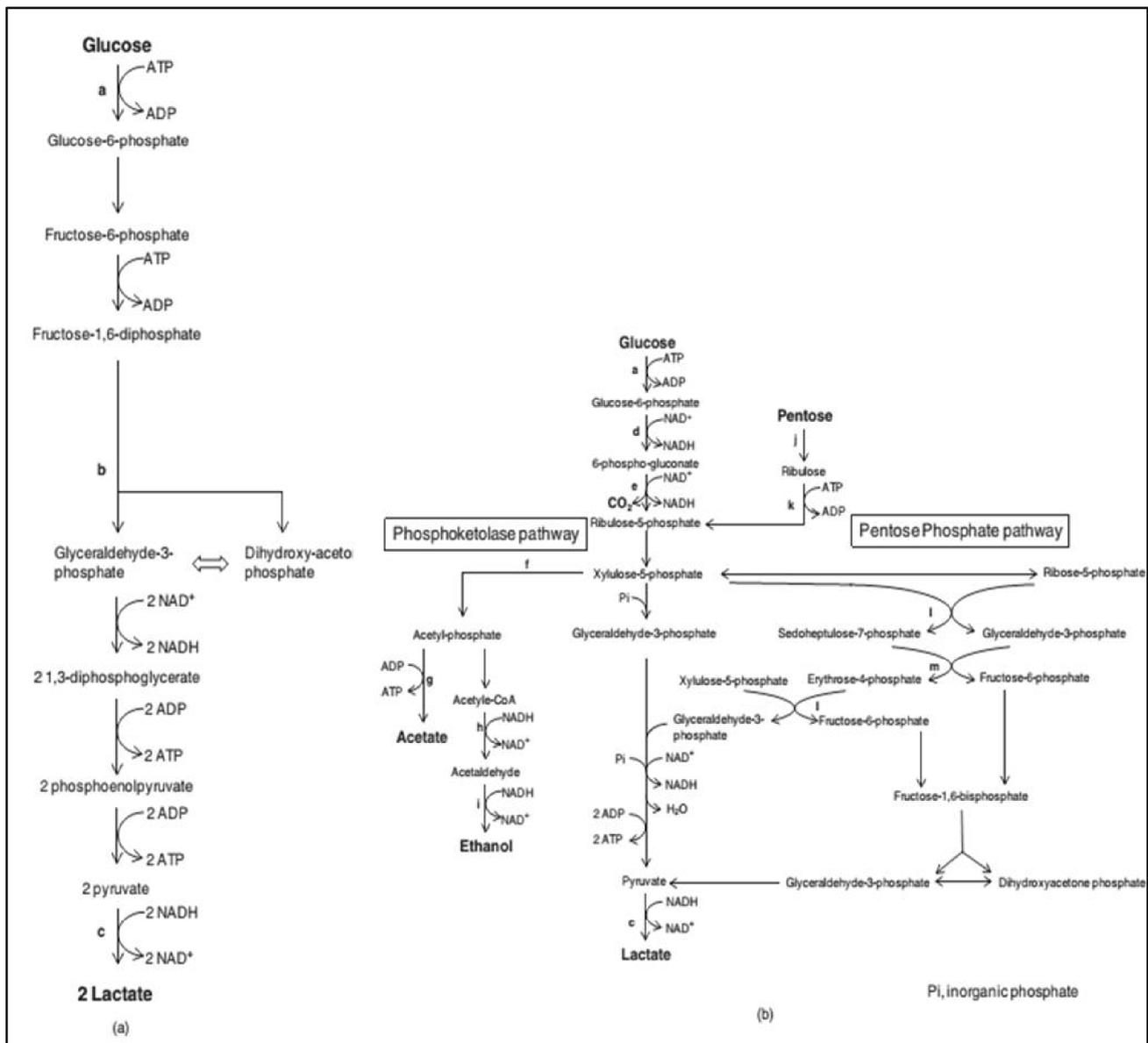


Figure 9: Principales voies cataboliques du glucose par les BL: (a) voie homolactique (EMB); (b) voie hétérolactique (6-PG/PK) (Endo and Dicks, 2014).

Les enzymes sélectionnés sont : a, glucokinase ; b, fructose-1,6-diphosphate aldolase ; c, lactate dehydrogenase ; d, glucose-6-phosphate dehydrogenase ; e, 6-phosphogluconate dehydrogenase ; f, phosphoketolase ; g, acetatekinase ; h, acetaldehyde dehydrogenase ; i, alcohol dehydrogenase ; j, pentose isomerase ; k, ribulokinase ; l, transketolase ; m, transaldolase.

d'Embden-Meyerhof-Parnas ; EMP) engendre presque exclusivement de l'acide lactique comme produit final, désignant ainsi un métabolisme à fermentation homolactique. La voie du 6-phosphogluconate/phosphoketolase (6-PG/PK), donnant des quantités importantes d'autres produits finaux tels que l'éthanol, l'acétate et le CO₂ en plus de l'acide lactique, désigne un métabolisme à fermentation hétérolactique (figure 9). Diverses conditions de croissance peuvent altérer de manière significative la formation du produit final. Ces changements peuvent être attribués à une modification du métabolisme du pyruvate et/ou à l'utilisation d'accepteurs d'électrons externes tels que l'oxygène, dans les deux modes respiratoire et non respiratoire, ou des composés organiques (Endo and Dicks, 2014).

Historiquement les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* forment le corps du groupe des 20 genres. En technologie alimentaire les genres *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* sont considérés comme les plus importants. Les BL peuvent être divisées en bâtonnets (*Lactobacillus* spp. et *Carnobacterium* spp.) et en coques (tous les autres genres). Une exception pour le genre *Weissella* qui, par définition, peut inclure à la fois des coques et des bâtonnets (Axelsson, 2005).

La classification des BL, décrite ci-dessus, est largement basée sur les caractères phénotypiques et biochimiques. En pratique, dans l'identification de routine des isolats, ces caractéristiques ne peuvent pas suffire pour attribuer définitivement une souche à une espèce particulière. Aujourd'hui, avec la disponibilité de la technologie rapide et automatique de séquençage de l'ADN, le séquençage direct du gène de l'ARNr 16S est la méthode la plus puissante pour la classification des BL (Giraffa and Carminati, 2008) (figure 10).

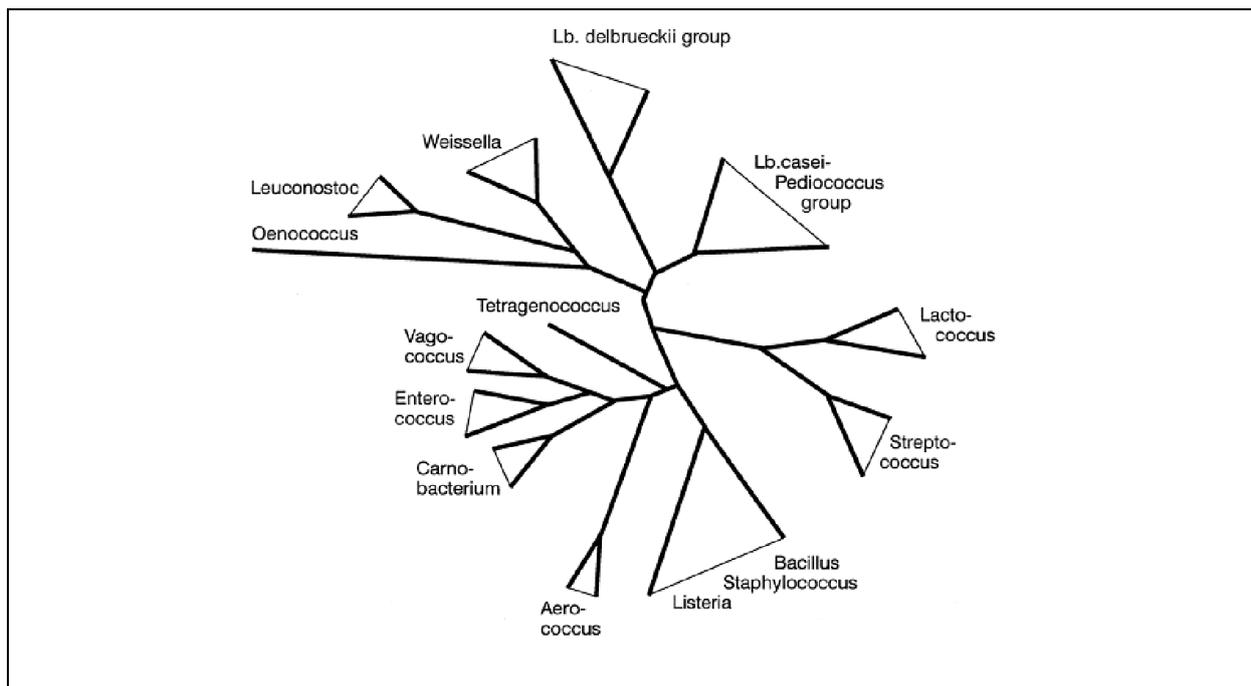


Figure 10 : Schéma d'un arbre phylogénétique, sans racines, des BL ; les distances évolutives sont approximative (Axelsson, 2005).

2.1.2 Bactéries lactiques impliquées dans la fermentation des céréales

Les BL, spécifiquement adaptées, jouent un rôle important dans la fermentation des céréales. Leur dominance dans les écosystèmes alimentaires diffère selon les pratiques traditionnelles de préparation. La variation des technologies de production et des paramètres tels que la nature des céréales, la température, et la durée de propagation, agissent sur leur diversité et sur l'implication d'une fermentation alcoolique, ou non, menée par les levures. (Hammes *et al.*, 2005).

Les pâtes aux levains qui sont des écosystèmes biologiques très complexes, principalement influencés par la composition et les interactions entre les processus de panification et les ingrédients, représentent des niches alimentaires très particulières dont la majorité des espèces isolées régulièrement appartiennent, à quelques exceptions près, aux genres de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, et *Weissella* (Guyot, 2010). Le plus grand nombre d'espèces identifiées (> 60 espèces) sont des lactobacilles, du fait de leur métabolisme des glucides hautement adapté (par exemple, la capacité de fermentation du maltose de *L. fermentum*, *L. reuteri* et *L. sanfranciscensis*), et leur réponse au stress (par

exemple, la réponse au stress acide associée à la production de protéines de stress) (De Vuyst *et al.*, 2014). Les lactobacilles typiques des levains sont représentés par *L. sanfranciscensis*, *L. pontis*, *L. panis*, *L. paralimentarius*, *L. frumenti*, *L. spicheri*, *L. rossiae*, *L. zymae*, *L. acidifarinae*, *L. hammesii*, *L. nantensis*, et *L. mindensis*. Alors que les weissellas (*W. cibaria*, *W. confusa*), les pedicoques (*P. acidilactici*, *P. pentosaceus*), et les leuconostoques (*Leu. mesenteroides*, *Leu. citreum*) sont moins prédominants dans les levains. Les lactocoques, les entérocoques et les streptocoques sont très minoritaires (Chavan and Chavan, 2011; De Vuyst *et al.*, 2014).

Les BL hétérofermentaires et homofermentaires généralement associées aux boissons et aliments fermentés à base de céréales autres que les pâtes aux levains traditionnels, appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus*. Quelles que soient les méthodes d'investigation utilisées, il semble qu'il y ait un consensus général pour dire que les BL appartenant aux genres cités ci-dessus sont souvent isolées, et que *L. plantarum* et/ou *L. fermentum* sont souvent les espèces dominantes (Blandino *et al.*, 2003; Guyot, 2010). Les espèces du genre *Lactobacillus* ont été régulièrement isolées des aliments fermentés à base de céréales tels que *bushera* en Ouganda (Muyanja *et al.*, 2003), *togwa* en Tanzanie (Mugula *et al.*, 2003), *Pozol* au Mexique (Ampe *et al.*, 1999), *Mawé* au Togo et au Bénin (Nout, 2009), *hussuwa* au Soudan (Yousif *et al.*, 2010), *poto poto* et *degué* dans la République du Congo (Abriouel *et al.*, 2006), et *koko* au Ghana (Lei and Jakobsen, 2004). Les lactobacilles forment le groupe dominant en association avec des coques ou coccobacilles appartenant principalement aux genres *Weissella*, *Pediococcus* et *Lactococcus*. Cependant, il ya quelques aliments à base de céréales fermentées dans lesquels les coques sont dominants ou représentent une part importante du microbiote (Guyot, 2010).

2.2 Flore fongique et céréales fermentées

2.2.1 Propriétés et caractérisation de la flore fongique

Les champignons sont des organismes importants en raison de leur fonction dans les différents écosystèmes. Certaines espèces forment des symbioses mutualistes avec divers espèces de plantes, d'algues, et d'animaux. Les champignons sont également d'une grande importance économique. Ils ont été domestiqués pour une utilisation dans la production du fromage, en industrie pharmaceutique et en biotechnologique. D'autres espèces sont cultivées

ou recueillies à l'usage alimentaire. Toutefois, les champignons causent plusieurs millions de dollars de dégâts chaque année par la détérioration des aliments (production de mycotoxines), la destruction des matériaux utilisés, et les maladies causées aux plantes, aux animaux et aux humains (Foster and Bills, 2004).

Les mycètes constituent un groupe extrêmement vaste. Ce sont des organismes eucaryotes dont les cellules sont pourvues de paroi. Hétérotrophes, leur appareil végétatif est constitué d'un thalle porteur de spores et capables de reproduction sexuée et asexuée. Les champignons filamenteux ou moisissures ont des thalles pluricellulaires constitués d'un mycélium et d'organes de fructification. Les formes unicellulaires sont appelées des levures (Botton, 1990).

Plusieurs étapes de caractérisation suivent l'isolement afin de différencier les mycètes les uns des autres. L'identification des moisissures repose encore en grande partie sur les caractéristiques macroscopiques et microscopiques (aspect et couleur du thalle, morphologie des organes de reproduction), tandis que celle des levures elle repose sur l'étude du métabolisme glucidique ainsi que sur des critères morphologiques (filamentation, chlamydosporulation, type de bourgeonnement, présence d'une capsule) (Guarro *et al.*, 1999; Foster and Bills, 2004).

Lorsque les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques sont insuffisants pour identifier un champignon ; les analyses chimiques sont utilisées. Les méthodes chromatographiques et spectroscopiques permettent l'analyse qualitative et quantitative des métabolites et des composants de la membrane cellulaire (les polysaccharides, les lipides insaponifiables, les acides gras, et les substances volatils et non volatils). Cependant, les caractéristiques décrites ci-dessus ne peuvent pas suffire pour attribuer définitivement une souche à une espèce particulière. Aujourd'hui, le séquençage de l'ADNr, des espaceurs ITS et ETS (Internal/External transcribed spacer) ou encore de l'espace IGS (intergenic spacer), est largement utilisé dans l'identification moléculaire des mycètes (Guarro *et al.*, 1999).

2.2.2 Flore fongique impliquée dans la fermentation des céréales

Les levures font partie du microbiote de quelques aliments fermentés à base de céréales tels que *mawé*, *idli*, *puto*, *pozol* et les pâtes au levain (Kofi and Nout, 2010). Le pain au levain San Francisco, en est un exemple, où la levure *Sacharomyces cerevisiae* joue un rôle important dans la fermentation. La présence et la croissance d'autres espèces de levures ont été rapportées comprenant *Kazachstania exigua* [synonyme (syn.) *Saccharomyces exiguus* ; anamorphe *Candida (Torulopsis) holmii*], *Candida humilis* (syn. *Candida milleri*), *Pichia kudriavzevii* (syn. *Issatchenkia orientalis* ; anamorphe *Candida krusei*), *Torulasporea delbrueckii* (anamorphe *Candida colliculosa*), et *Wickerhamomyces anomalus* (syn. *Pichia anomala* et *Hansenula anomala* ; anamorphe *Candida pelliculosa*). Ces levures évoluent en présence des BL indigènes précédemment décrites comme *L. sanfranciscensis* (unique dans ces écosystèmes), *L. plantarum*, et diverses autres espèces de *Lactobacillus*, de *Leuconostoc*, et de *Pediococcus* (De Vuyst *et al.*, 2014).

Les levures sont aussi intimement impliquées dans la production de toutes les boissons alcoolisées. Cette association dépend de la capacité de certaines espèces de levure à fermenter rapidement les sucres en éthanol et également leur capacité à tolérer une concentration d'éthanol de 15 à 20 % (v/v). Les principales levures qui fermentent l'amidon des céréales saccharifiées, en alcool, sont *Saccharomycopsis fibuligera*, *Sacharomycopsis burtonii*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida lactosa*. D'autres levures des genres *Hansenula*, *Pichia* et *Torulopsis* sont également détectées dans certains starters amylolytiques et boissons fermentées (Fleet, 1997; Tamang and Fleet, 2009). Par ailleurs, les levures sont fréquemment associées aux BL, en particulier lorsque le procédé conduit à des boissons alcoolisées acides. *P. pentosaceus* et des espèces de *Lactobacillus* ont été rapportées comme dominantes dans des boissons alcoolisées en association avec des levures des espèces de *Saccharomyces* (Jespersen, 2003).

Les champignons filamenteux dans les aliments fermentés à base de céréales sont relativement limités et ne semblent pas avoir un rôle important dans le processus de fermentation. Ils sont surtout présents dans les aliments et les boissons fermentés asiatiques traditionnels préparés par des starters amylolytiques mixtes. Les espèces rapportées appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Mucor* et *Rhizopus* (Tamang, 2010c).

3. LES METHODES MOLECULAIRES DE CARACTERISATION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS LES MATRICES ALIMENTAIRES

Le contrôle des procédés de fermentation nécessite des connaissances de la physiologie, du métabolisme et des propriétés génétiques des microorganismes impliqués. La recherche de leur présence, leur nombre et leur type dans les aliments, est d'une importance primordiale pour maîtriser les écosystèmes alimentaires. Le but est d'assurer la qualité et la sécurité des produits, et de répondre aux exigences strictes du marché et des consommateurs. Par conséquent, il est aussi important de détecter des microorganismes dangereux ou indésirables présents (Giraffa and Carminati, 2008).

Il ya trois applications majeures des techniques de caractérisation moléculaire : (a) identifier le microbiote ; (b) déterminer le nombre total des microorganismes dans les échantillons alimentaires ; et (c) la détection de souches et/ou de biotypes spécifiques. Peu importe l'objectif premier de ces analyses microbiennes (contrôle de la qualité des aliments, conservation des aliments, efficacité des ferments et surveillance de certains espèces/souches), le niveau taxonomique de la discrimination microbienne devrait être initialement déterminé. Dans l'identification microbienne la classification dépend de la sensibilité de la technique utilisée (soit phénotypique ou génotypique). Elle peut varier des genres, des espèces et au niveau de la sous-espèce ou la souche (sous- typage) (Giraffa and Carminati, 2008).

3.1 Méthodes culture-indépendantes

La métagénomique est une discipline récente basée sur l'analyse simultanée de l'ensemble des génomes d'une communauté microbienne. Elle permet d'identifier les microorganismes, sans isolement sur des milieux de culture, ce qui représente un avantage majeur compte tenu du très grand nombre de microorganismes difficiles à cultiver ou non cultivables (Giraffa and Carminati, 2008).

3.1.1 Temporal temperature gradient gel electrophoresis/denaturing gradient gel electrophoresis -TTGE/DGGE

La TTGE et la DGGE ont été introduites en microbiologie de l'environnement pour déterminer la diversité génétique et la dynamique microbienne dans différents écosystèmes comme les biofilms, les sols, et les aliments fermentés(Ogier *et al.*, 2002). Ces deux techniques sont essentiellement basées sur l'amplification des gènes codants pour l'ARNr

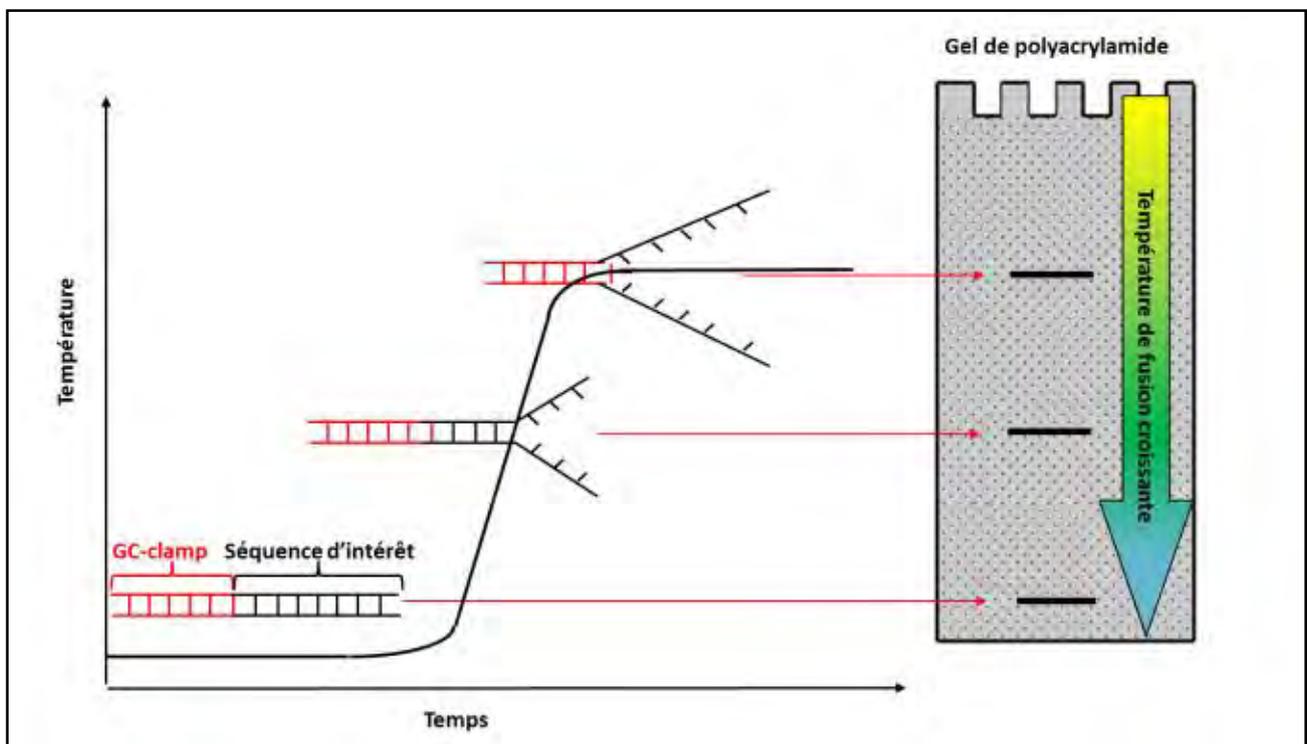


Figure 11 : Représentation schématique du principe de la TTGE (Macé, 2013).

(région V6-V8 ou V3 ; bactéries, région D1/D2 ; levures), suivie de la séparation des fragments d'ADN (figure 11). La séparation est basée sur la diminution de la mobilité électrophorétique de l'ADN double brin, partiellement dénaturé, dans des gels de polyacrylamide contenant un gradient linéaire d'un dénaturant chimique comme le formamide et l'urée (DGGE), ou un gradient linéaire de température (TTGE). Les fragments obtenus après amplification par PCR, présentant une taille similaire mais des séquences différentes, peuvent être séparés selon leurs propriétés de fusion (Giraffa and Neviani, 2001).

Bien que le gène de l'ARNr 16S offre les avantages des bases de données robustes et des amorces phylogénétiques bien caractérisées, la PCR-TTGE (ou PCR-DGGE) ne pouvait pas se limiter à ces marqueurs de gènes ribosomiques, qui souvent, présentent une hétérogénéité intraspécifique. Pour surmonter cette limitation, l'utilisation de différents marqueurs comme les gènes codants pour l'ARNr 23S, le facteur d'élongation Tu, la protéine *RecA*, et la sous unité β de l'ARN polymérase (*rpoB*) ont été proposés comme une alternative au gène de l'ARNr 16S (Giraffa and Carminati, 2008).

L'identification, des espèces ou des genres présents, est obtenue en découpant les bandes individuelles du gel et en séquençant les fragments d'ADN directement ou après clonage. Il est également possible de mettre en place des bases de données des empreintes obtenues pour différentes espèces et assigner les bandes correspondantes (Ben Omar and Ampe, 2000; Parayre *et al.*, 2007). Bien que ces techniques soient fiables et reproductibles, elles sont peu sensibles aux espèces minoritaires dans les matrices étudiées. Il est supposé que l'espèce doit représenter au minimum 1% de la communauté totale pour être détectée (Muyzer, 1999). De plus, la multiplicité des opérons notamment pour le gène de l'ARNr 16S entraîne parfois la présence de plusieurs bandes pour une espèce donnée ou des séquences d'espèces différentes possèdent la même distance de migration. Ces deux cas peuvent entraîner une surestimation ou une sous-estimation de la diversité de l'écosystème microbien étudié (Licitra *et al.*, 2007). Ces méthodes ont été appliquées lors de nombreuses études sur des produits alimentaires très différents ; les produits laitiers, le levain, la bière, les produits carnés et également beaucoup de produits fermentés à base de céréales (Cocolin and Ercolini, 2008; Giraffa and Carminati, 2008).

3.1.2 Terminal restriction fragment length polymorphism -T-RFLP

La méthode T-RFLP est une technique d'empreintes moléculaires basée sur l'analyse des fragments de restriction de l'ADNr, double brins marqués par fluorescence, adaptée de la méthode initiale RFLP. Cependant, contrairement à la RFLP où tous les fragments digérés sont détectés, l'analyse se limite juste aux fragments digérés marqués, ce qui réduit la complexité des profils générés par la RFLP (Giraffa and Carminati, 2008).

Les produits de la PCR sont obtenus en utilisant des amorces marquées habituellement conçues pour s'aligner à une région génique ciblée ; souvent de l'ADNr 16S ou de l'ADNr fongique. Ils sont ensuite digérés par une enzyme de restriction. La variation des positions des sites de restriction sur les séquences permet d'obtenir, à la fois, des fragments de tailles différentes et marqués en 5'terminal avec le fluorochrome (phosphoramidite) (Giraffa and Neviani, 2001).

La détermination de la taille des fragments est effectuée par électrophorèse capillaire avec des marqueurs moléculaires. Seuls les fragments 5' terminaux marqués sont détectés et comparés à une base de données pour identifier les populations bactériennes (regroupés en unités taxonomiques opérationnelles, OTU). Les données de fluorescence sont converties en électrophorégrammes pour lesquels les pics représentent les fragments de différentes tailles, et l'aire de ces pics indique la proportion relative des fragments. Le principe est qu'une espèce bactérienne donnée produira un fragment terminal unique d'une taille donnée. L'intensité de la fluorescence est intégrée pour déterminer pseudo-quantitativement l'abondance relative d'OTU par rapport à la fluorescence totale (Bokulich and Mills, 2012).

Comme pour la TTGE/DDGE, la T-RFLP ne pouvait pas se limiter à des marqueurs de gènes ribosomiques. L'ensemble de l'accumulation de nouvelles séquences de gènes de diverses régions d'ADN moins conservées pourraient permettre la comparaison des profils pour n'importe quel groupe de gène d'intérêt. Néanmoins, dans la pratique, plusieurs espèces peuvent avoir un fragment terminal de la même taille et dans ce cas la diversité de l'écosystème peut être sous-estimée. Une surestimation de la diversité peut aussi être générée par des restrictions non spécifiques ou incomplètes. De ce fait, l'utilisation de plusieurs amorces marquées et enzymes de restriction peut augmenter la spécificité et la résolution (Schütte *et al.*, 2008).

La T-RFLP a d'abord été développée par Liu *et al.*(1997), pour étudier et analyser les communautés microbiennes dans différents environnements. Depuis, elle est devenue une technique populaire pour la détermination des profils microbiens dans différents écosystèmes (Kerkhof *et al.*, 2000; Aiken, 2011; Aomatsu *et al.*, 2012; Fraher *et al.*, 2012). L'utilisation de la T - RFLP dans l'étude des populations microbiennes dans les aliments fermentés est encore limitée. Peu de systèmes fermentaires ont été analysés par cette méthode d'empreintes moléculaires. Les travaux publiés se sont intéressés principalement aux produits laitiers tels que les fromage et les yaourts, et à la bière (Rademaker *et al.*, 2005, 2006; Sánchez *et al.*, 2006; Bokulich *et al.*, 2012; Fuka *et al.*, 2013).

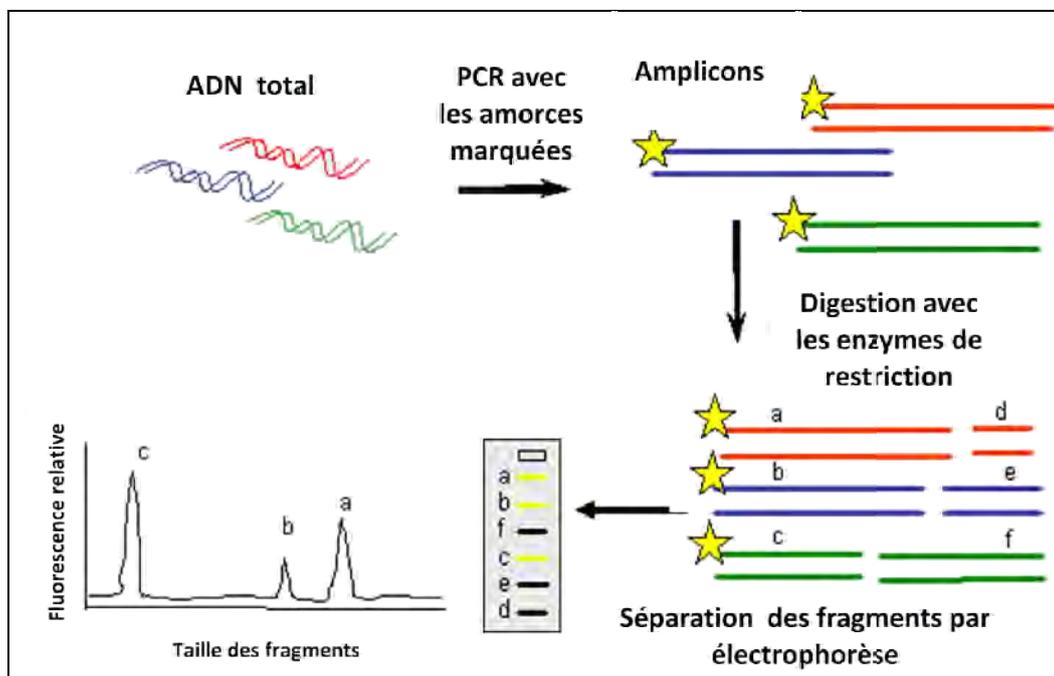


Figure 12 : Principe de la méthode Terminal restriction fragment length polymorphism -T-RFLP, adaptée de Kaksonen (2014).

3.1.3 Autres méthodes d'empreintes moléculaires

La Single Strand conformation polymorphism (SSCP) est également une technique d'empreintes moléculaires. Les fragments d'ADN simple brin, préalablement dénaturés, sont séparés par électrophorèse en fonction de la différence de mobilité de leurs structures secondaires. Aucun dénaturant n'est utilisé dans ce procédé pour détecter la mobilité de la structure secondaire des fragments d'ADN. Chaque bande de gel SSCP correspond à une séquence microbienne distincte, indiquant la présence d'une souche ou d'une espèce microbienne récupérée à partir de l'échantillon. La principale limitation de la SSCP, qui est similaire à la DGGE / TGGE, est que la séquence d'ADN simple brin peut former plus d'une conformation stable et ce fragment peut être représenté par plusieurs bandes (Giraffa and Neviani, 2001). La SSCP a été utilisée pour l'étude de la diversité microbienne de l'eau et des sols, mais assez peu pour les produits alimentaires. La SSCP a été appliquée pour évaluer la diversité et l'évolution des bactéries et des levures dans certains fromages (Ndoye *et al.*, 2011).

La technologie des amorces marquées par fluorescence a permis aussi d'automatiser les méthodes classiques les plus répandues, basées sur l'analyse de l'ADN des populations microbiennes telles que l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), la RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), l'AP-PCR (Arbitrarily Primed-PCR), et l'AFLP (Adaptor Fragment Length Polymorphism). Bien que dans la plupart des cas l'automatisation de ces méthodes ait amélioré leur sensibilité par rapport à l'approche classique, les applications aux populations microbiennes alimentaires dans une approche culture-indépendante de la sont limitées (Giraffa and Carminati, 2008).

3.1.4 Les nouvelles méthodes de séquençage à haut-débit

Le séquençage nouvelle génération (SNG) décrit plusieurs technologies qui permettent le séquençage massif et parallèle des fragments d'ADN hétérogènes. Ces fragments sont constitués de segments courts amplifiés en utilisant des amorces universelles ciblant des marqueurs de gènes connus, principalement l'ADNr16S des procaryotes et les marqueurs fongiques ITS de l'ADNr fongique. Les SNG à haut débit ont changé la façon d'étudier les communautés microbiennes. Elles diffèrent de la méthode de séquençage Sanger par, la longueur des lectures obtenues (de 30 à 400 pb selon la technologie utilisée contre 500 à plus 900 pb pour la technique de Sanger), la rapidité et surtout la quantité des données générées par réaction (entre 500 MB et 6 GB) (Bokulich and Mills, 2012).

Le pyroséquençage, première technique SNG disponible dans le commerce, a connu l'utilisation la plus vaste en microbiologie alimentaire. Il a été utilisé pour étudier la diversité bactérienne d'un certains nombres d'aliments fermentés (Humblot and Guyot, 2009; Nam *et al.*, 2012; Chao *et al.*, 2013; Nalbantoglu *et al.*, 2014). Le marché des séquenceurs SNG est couvert par 3 grands groupes ; Roche, Illumina et Life Technologies. Les deux types de séquenceurs SNG couramment utilisés pour le profilage des communautés microbiennes sont le 454-Roche et Illumina (Bokulich and Mills, 2012).

3.2 Méthodes culture-dépendantes

Les méthodes culture-dépendantes nécessitent l'isolement et la culture des souches préalablement à leur identification selon leurs caractéristiques phénotypiques et/ou génotypiques. Leur identification est effectuée principalement par le biais des méthodes biochimiques et phénotypiques. Néanmoins, les méthodes phénotypiques, traditionnelles, sont souvent insuffisantes pour identifier de manière fiable de nombreuses espèces et/ou les souches spécifiques dans les communautés microbiennes complexes. Cela a conduit au développement des méthodes d'identification moléculaire, en particulier celles basées sur la PCR. L'automatisation de nombreuses techniques couplée au développement des statistiques et de la bioinformatique ont permis le remplacement des procédures classiques dans les laboratoires de microbiologie alimentaire (Ercolini *et al.*, 2001).

Le séquençage de l'ADNr est la technique la plus largement utilisée pour identifier les espèces microbiennes isolées à partir des aliments ou autres écosystèmes. Un certain nombre de méthodes d'identification basées sur le séquençage, ont été utilisées pour analyser les gènes de l'opéron ARNr ainsi que d'autres gènes conservés chez les bactéries. Concernant l'opéron ARNr, le gène de l'ARNr 16S est généralement amplifié pour l'identification bactérienne, tandis que les gènes de l'ARNr fongique (5.8S, 18S et 25S) et/ou les marqueurs ITS sont utilisés pour l'identification des levures et des moisissures. Une fois la séquence entière ou partielle du gène est déterminée, elle est comparée à des séquences connues de microorganismes à l'aide de logiciels spécialisés et/ou des outils en ligne (Hervé *et al.*, 2008).

L'accumulation des informations sur les séquences d'ADNr c'est avérée efficace pour l'identification comparative des microorganismes, conduisant à la reconnaissance de milliers d'espèces microbiennes. Toutefois, les données des séquences du gène ARNr 16S ne permettent pas l'identification des espèces étroitement liées. L'utilisation des gènes de ménage

Tableau 5 : Avantages et limites de l'utilisation des principales techniques moléculaires dans l'identification et le typage microbien (Cocolin and Ercolini, 2008).

Méthode	Avantages	Limites
A. Identification		
- Hybridation ADN-ADN	Haut niveau de discrimination; faciliter d'interprétation; reproductibilité élevée	Lourde ; longue; coûts élevés
- Méthodes basées sur la PCR (e.g. ARDRA-PCR, ITS (ou RISA)-PCR)	Rapide ; reproductibilité élevée ; facile à utiliser et à interpréter ; cout faible ou modéré	Niveau de discrimination modérée
- Séquençage de l'ADN	Haut niveau de discrimination; meilleure précision et reproductibilité ; plates-formes automatisées disponibles ; bases de données publiques disponibles	Haute compétence technique est nécessaire ; coûts élevés
B. Typage		
<i>Méthodes RFLP</i>		
- Ribotypage	Haut niveau de discrimination; faciliter l'interprétation ; élevé reproductibilité ; plates-formes automatique disponibles	Lourde ; longue; coûts élevés
- REA-PFGE	Excellent niveau de discrimination ; excellente reproductibilité ; facilité d'interprétation ; bases de données publiques disponibles	Lourde ; difficile à utiliser ; longue; coûts élevés
<i>Méthodes basées sur la PCR</i>		
- RAPD-PCR; Rep-PCR	Haut niveau de discrimination; rapidité ; utilisation et interprétation facile ; faibles coûts	Reproductibilité modérée ; aucune base de données publiques disponibles
- ITS (ou RISA)-PCR	Rapide ; utilisation et interprétation faciles ; reproductibilité élevée ; faibles coûts	Niveau de discrimination modérée ; aucune base de données publique disponible
- AFLP	Modérément facile à utiliser et interpréter ; haut pouvoir de discrimination; reproductibilité élevée ; plates-formes automatique disponibles	Coûts élevés ; aucune base de données publiques disponibles

ARDRA-PCR, Amplification Ribosomal DNA Restriction Analysis-PCR; ITS-PCR, Internal Transcribed Spacer-PCR; RISA-PCR, rRNA gene Internal Spacer Analysis PCR; RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism; REA-PFGE, Restriction Endonuclease Analysis Pulsed Field Gel Electrophoresis; RAPD-PCR, Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR; Rep-PCR, Repetitive element sequence-based-PCR; AFLP, Adaptor Fragment Length Polymorphism.

tels que *rpoA*, *rpoB*, *pheS* et *recA* des bactéries, et la β -tubuline des champignons sont de plus en plus utilisés comme marqueurs phylogénétiques pour plus de résolution taxonomiques (Guarro *et al.*, 1999; Vandamme *et al.*, 2014).

L'introduction des techniques de biologie moléculaire a donné une variété de méthodes de typage à base d'ADN, permettant la discrimination entre les isolats d'une espèce donnée. Selon les aspects techniques, les méthodes de typage génétiques actuellement utilisés sont divisées en plusieurs catégories avec différentes résolutions taxonomiques. Le typage peut être basé sur l'amplification par PCR de régions d'ADN correspondant à des gènes connus. La RAPD (random amplified polymorphic DNA), est fondée sur l'utilisation d'amorces courtes dont la séquence est choisie au hasard. La REP-PCR (Repetitive element sequence-based-PCR) vise l'amplification de fragments à partir de séquences répétées dans le génome bactérien. Les fragments d'ADN obtenus, dans les deux méthodes, sont séparés par électrophorèse en gels d'agarose selon leurs tailles et les profils électrophorétiques sont ensuite comparés (Hervé *et al.*, 2008). Le typage peut être également basé sur les profils de restrictions, obtenus par l'utilisation d'endonucléases de restriction qui coupent l'ADN au niveau de séquences spécifiques générant des fragments plus ou moins longs. Le nombre et la taille des fragments générés sont caractéristiques de l'isolat étudié. La séparation des fragments par électrophorèse en gel d'agarose permet de comparer les profils de restriction (Cocolin and Ercolini, 2008).

Il existe aussi des variantes de ces méthodes de typage microbien basées sur les profils d'amplification, de restriction enzymatique ou encore la combinaison des deux approches. La plupart des techniques de typage et d'identification couramment utilisées sont résumées dans le tableau (5).

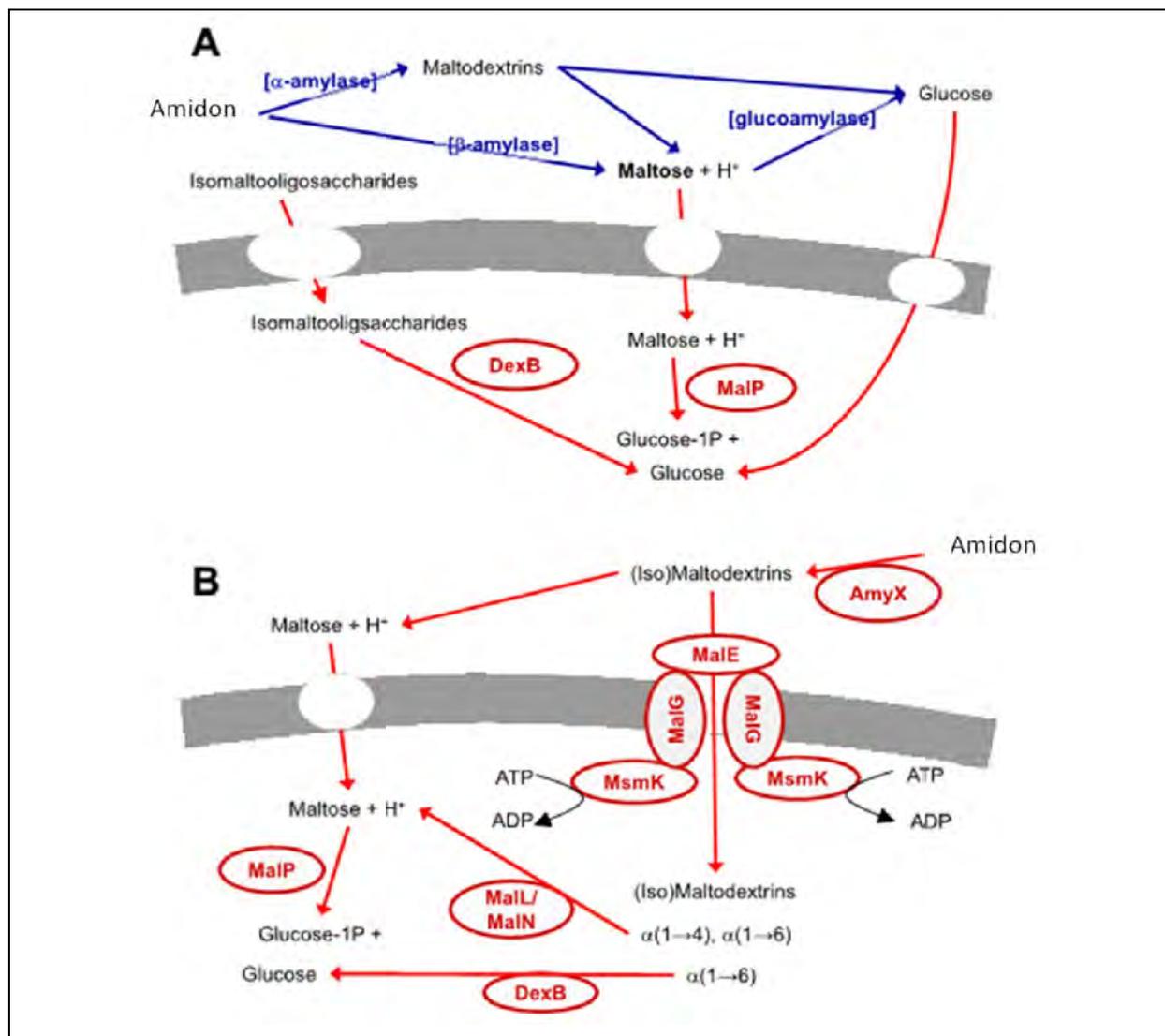


Figure 13 : Métabolisme de l'amidon et la conversion des maltodextrines dans les pâtes au levain (Nakai *et al.*, 2009; Gänzle and Follador, 2012; Gänzle, 2014).

- (A) enzymes et voies métaboliques dans les céréales-C3 (blé, orge, avoine) à activité amylolytique endogène élevée. (B) enzymes et voies métaboliques dans les céréales-C4 (céréales tropicales ; maïs, sorgho, millet) à activité amylolytique endogène faible. Les conversions par les enzymes des céréales sont indiquées en bleu ; celles par des enzymes des BL sont indiquées en rouge. MalP; maltose phosphorylase, DexB; 1,6- α -glucosidase, AmyX; amylolyses extracellulaires des BL, MalN et MalL ; Glucosyl hydrolases intracellulaires amylopullulanases, hydrolysent les liaisons glucosidiques α (1→6) et α (1→4) des maltodextrines et isomaltodextrines, MalG et MsmK ; transporteurs à ATP-binding cassette (ABC) importent les maltodextrines à l'intérieur du cytosol.

4. MODIFICATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DURANT LA FERMENTATION DES CÉREALES

Divers composés sont formés dans la fermentation des céréales par la dégradation de l'amidon, des protéines et des lipides. Les métabolites générés par les activités enzymatiques d'origine endogène et microbienne, affectent les propriétés organoleptiques des produits finaux. La majorité de la littérature s'est intéressée au rôle des BL dans cette transformation compte tenu de leur prédominance dans les aliments fermentés à base de céréales (Mehta *et al.*, 2012).

4.1 Action sur les principaux substrats

4.1.1 L'amidon

Les grains des céréales-C3^(*) (blé, orge et seigle) contiennent des enzymes amylolytiques (α -amylase, β -amylase et glucoamylase) qui libèrent des maltodextrines, du maltose et du glucose (activité endogène). Les céréales-C4^(*) (sorgho, millet, maïs) sont aussi dotées de ces enzymes mais dépourvues de l'activité de la β -amylase. Ces activités enzymatiques endogènes jouent un rôle important dans la dégradation de l'amidon, source principale des sucres fermentescibles (Gänzle, 2014) (figure 13).

L'hydrolyse de l'amidon n'est pas fréquente chez les BL, mais les BL amylolytiques ont souvent été isolées à partir d'aliments à base de céréales fermentées et peuvent représenter environ 10% de la population des BL (Guyot, 2010). L'Activité d'amylase extracellulaire a été caractérisée chez plusieurs lactobacilles (figure 14), notamment chez *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. manihotivorans*, *L. amylovorus*, et *L. gasseri* (Gänzle and Follador, 2012). Elle semble jouer un rôle important dans le microbiote des céréales fermentées en rendant disponibles les substrats nécessaires pour la croissance des BL non amylolytiques (Guyot, 2012).

^(*) C3 : Céréales utilisant pour la photosynthèse des molécules à trois carbones pour la formation de leurs sucres (*cycle de Calvin*). Elles sont cultivées principalement dans les régions tempérées. ^(*) C4 : Céréales utilisant pour la photosynthèse des molécules à trois et à quatre carbones pour la formation de leurs sucres. Elles sont cultivées principalement dans régions tropicales (Morot-Gaudry *et al.*, 2012).

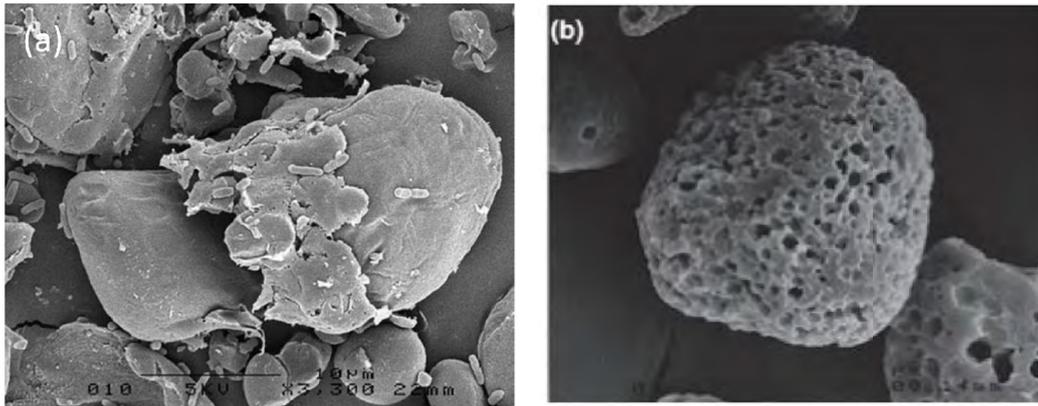


Figure 14 : (a) Hydrolyse des granules d'amidon de blé par *L. plantarum* A6, (b) micrographie électronique à balayage montrant l'effet de l' α - amylase produite par *L. plantarum* LPCR2-3 sur les granules d'amidon du maïs après fermentation (Guyot, 2010, 2012).

4.1.2 Les protéines

Les levures et les BL utilisent leurs activités enzymatiques pour induire plusieurs changements dans les protéines. De plus, la diminution du pH par la fermentation favorise l'action de certaines protéases endogènes des céréales ainsi que la dépolymérisation et la solubilisation des réseaux de gluten (Kamal-Eldin, 2012b) (figure15). Les différentes activités protéolytiques permettent de produire des acides aminés libres, qui agissent en tant que précurseurs d'arômes (Ardö, 2006; Gänzle *et al.*, 2007; Gänzle, 2014). L'effet de la protéolyse durant le processus de fermentation augmente le taux des acides aminés libres, ce qui a été obtenu sur différents aliments à base de céréales fermentées (Blandino *et al.*, 2003).

4.1.3 Les lipides

Les lipides sont des composants mineurs des céréales, toutefois ils ont un effet significatif sur la qualité des aliments fermentés à base de céréales. Les BL sont considérées comme faiblement lipolytiques par rapport à de nombreux autres groupes bactériens (par exemple, *Pseudomonas*, *Bacillus*, et *Achromobacter*). Les systèmes esterolytiques et lipolytiques des BL restent mal caractérisés. Les estérases des levures et des BL, peuvent être impliquées dans le développement des saveurs fruitées dans les aliments (Medina *et al.*, 2004). La dégradation des lipides a été rapportée jouer un rôle dans la formation de l'arôme dans les pâtes au levains (Gänzle *et al.*, 2007).

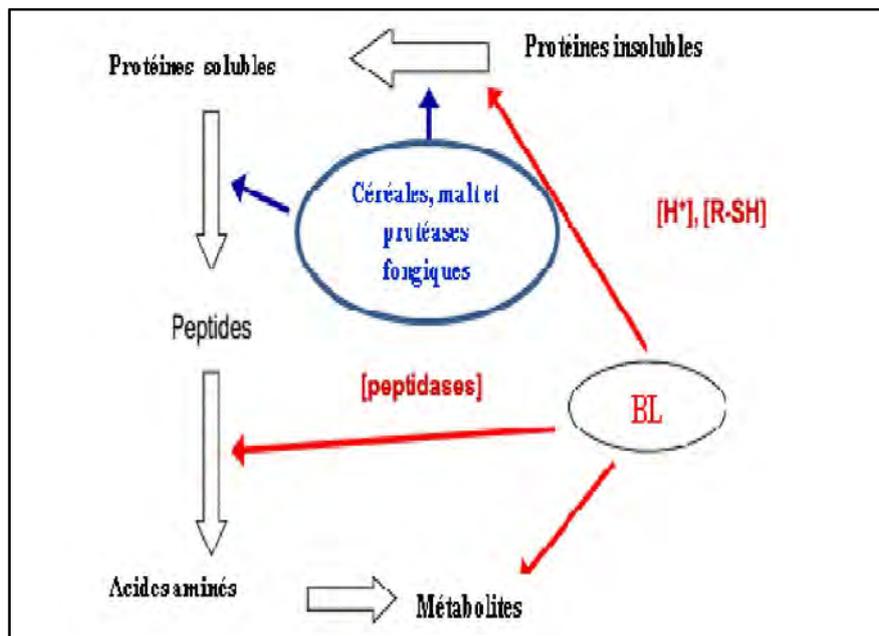


Figure 15: Vue d'ensemble sur la protéolyse des protéines (Gänzle, 2014).

Les conversions par les protéases des céréales des champignons sont représentées en bleu, celles des BL sont indiquées en rouge.

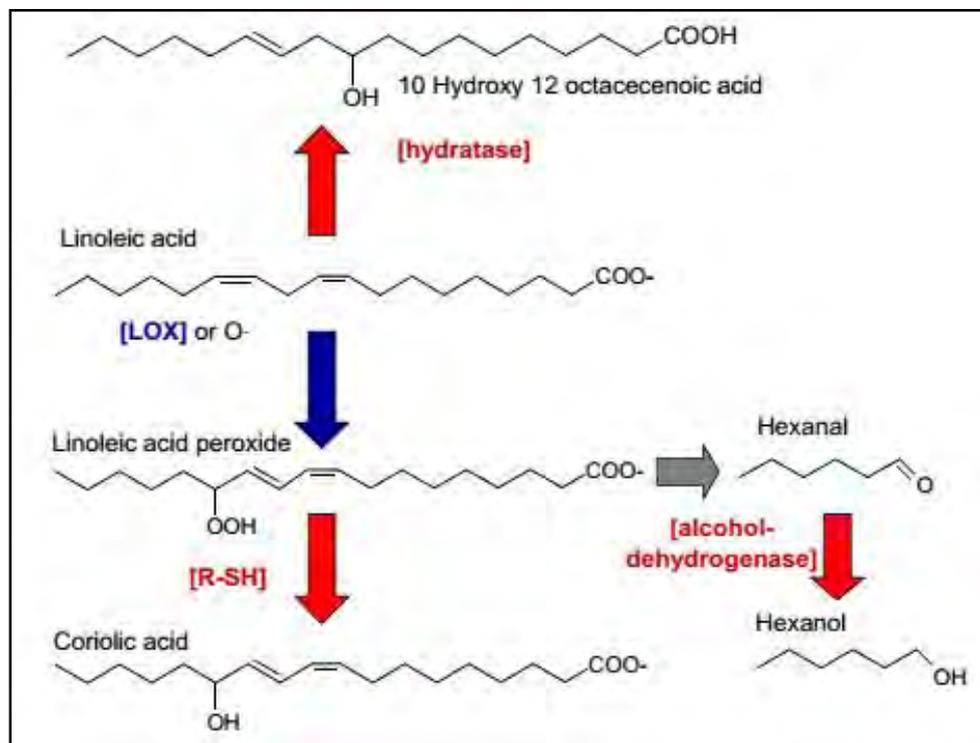


Figure 16: Conversion des acides gras (Gänzle, 2014).

Les conversions par les enzymes des céréales sont indiquées en bleu, celle des enzymes microbiennes sont indiquées en rouge.

Les réactions lipolytiques, conduisent à la libération d'acides gras libres en particulier les acides oléique, linoléique, linolénique, butyrique et palmitique. Les aldéhydes résultants de l'oxydation des lipides ont été également rapportés à l'origine de saveurs et d'arômes caractéristiques (figure 16). Par ailleurs, la peroxydation des lipides a des effets négatifs, en diminuant la qualité sensorielle et nutritionnelle des produits (Kamal-Eldin, 2012b).

Les lactobacilles convertissent les acides : oléique, linoléique et linolénique en acides gras hydroxylés. L'acide 10-hydroxy-12-octadécanoïque est le produit prédominant de la conversion de l'acide linoléique par les lactobacilles des levains. La lipoxygénase des céréales oxyde l'acide linoléique en peroxyde linoléique. En présence de cystéine, le peroxyde est chimiquement converti en son hydroxy-acide gras équivalent, l'acide coriolique ; un composé avec une activité antifongique. Les taux de thiol dans le levain de blé augmentent durant le métabolisme des lactobacilles hétérofermentaires. La dégradation chimique du peroxyde d'acide linoléique permet la formation de composés aromatiques actifs : les aldéhydes, notamment l'hexanal, le nonéanal, et le décadienal. Pendant la fermentations, ces aldéhydes sont convertis en alcools correspondants par l'activité de l'alcool déshydrogénase des lactobacilles hétérofermentaires (Gänzle, 2014).

4.2 Importance de la fermentation des céréales

La fermentation des aliments, dans une grande partie de l'histoire humaine, a été le moyen le plus commun de conservation des produits périssables. Elle contribue à plusieurs avantages comme l'ajout de nouveaux goûts, de saveurs, d'arômes et de textures. Elle permet également l'amélioration de la valeur nutritionnelle des aliments, l'augmentation de leur digestibilité, la production de vitamines, l'élimination de substances toxiques et la diminution de l'énergie et du temps de cuisson (Kamal-Eldin, 2012b).

4.2.1 La biopréservation

La fermentation joue un rôle clé dans la biopréservation des aliments, grâce à une variété de composés et de métabolites produits par le microbiote fermentaire, principalement par les BL ; acide organiques, CO₂, H₂O₂, diacétyl, acide phényllacétique, dipéptides cycliques, bactériocines, reutéline et acides gras. Ils agissant parfois de manière synergique dans les écosystèmes alimentaires complexes contre la détérioration des aliments et les micro-organismes pathogènes (Corsetti *et al.*, 2015).

Des espèces de BL, isolées à partir de céréales fermentées, appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* ont été décrites comme productrices de substances antibactériennes (Zacharof and Lovitt, 2012) et antifongiques (Crowley *et al.*, 2013; Bianchini, 2015). Les BL sont connues aussi pour leur aptitude à fixer les mycotoxines et à inhiber la croissance des moisissures toxigènes, en raison de leur acidification et de la production de composés de faible poids moléculaire au cours de la fermentation. Les acides organiques diffusent à travers la membrane des champignons et libèrent ainsi les ions hydrogène qui provoquent une chute du pH. En outre, les acides organiques augmentent la perméabilité de la membrane plasmique et neutralisent le gradient électrochimique des protons, tuant ainsi le microorganisme. La production des acides organiques, seule, n'explique pas l'activité antifongique. Plusieurs composés antifongiques ont été entièrement ou partiellement caractérisés mais l'effet synergique reste mal connu. Les études supposent une sorte d'interaction positive, même si cela n'a pas été prouvé pour de nombreux métabolites (Dalié *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2014).

4.2.2 Composés bioactifs et probiotiques

Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates auraient un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. Ils peuvent être inclus dans différents aliments, fermentés ou non (Ouweland and Röytiö, 2015).

La matrice alimentaire est connue pour avoir un rôle important dans la stabilité des probiotiques. Les aliments fermentés ne sont pas par tous considérés comme probiotiques (boissons alcoolisées et les viandes fermentées). Les composés bioactifs sont le produit des activités endogènes et/ou microbiennes de la matrice alimentaire. Leurs natures varient des molécules de bas poids moléculaire (les stéroïdes, les alcaloïdes, etc.), aux molécules de haute masse moléculaire (les hydrates de carbone et les protéines). Leurs effets physiologiques peuvent se rapporter à la diminution des taux de cholestérol, à l'action antioxydante, et à la modulation des lipides du système immunitaire ou d'autres effets bénéfiques. Ils sont également appelés *nutraceutiques* et les aliments qui en contiennent sont considérés comme des *aliments fonctionnels* et promoteurs de la santé (Kamal-Eldin, 2012a).

Les céréales sont des matières premières très appropriées pour le développement de divers microorganismes probiotiques et l'élaboration d'aliments fermentés fonctionnels. Le *togwa*, *bushera*, *mahewu*, *ben-saalga*, *boza* et *pozol*, sont des exemples d'aliments fermentés

à base de céréales aux potentiels probiotiques (Vasudha and Mishra, 2012). Les premiers Mayas utilisaient le *pozol* comme médicament pour contrôler la diarrhée, pour réduire la fièvre et guérir les infections intestinales. Vogel *et al.* (1999) ont constaté que les BL présentes dans le levain, sont similaire ou, dans certains cas, identiques aux espèces présentes dans le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux. *L. plantarum*, présente dans une variété d'aliments fermentés traditionnels à base de céréales, est également associée au tractus gastro-intestinal de l'homme. La colonisation de la muqueuse intestinale par des souches de *L. plantarum* isolées à partir des levains et de nombreuses céréales fermentées a également été rapportée (Todorov and Holzapfel, 2015).

La présence des microorganismes, notamment les BL, est importante pour améliorer le niveau des composés bioactifs dans les céréales. La fermentation du sarrasin, du germe de blé, de l'orge et du seigle, par *L. rhamnosus*, et *S. cerevisiae* a montré une augmentation significative du contenu phénolique et des activités anti-radicalaires (quantifiées par le diphenylpicryldrazyl) (Đorđević *et al.*, 2010). La capacité des BL à délivrer des peptides bioactifs aux propriétés antioxydantes, préventives contre le cancer et anti-hypertenseurs a été démontrée dans la fermentation au levain de différentes farines céréalières (Gobbetti *et al.*, 2013; Gänzle, 2014).

4.2.3 Composés aromatiques et volatils

Dans les aliments fermentés les substances qui déterminent la saveur sont synthétisées au cours de l'affinage, par l'accumulation de composés volatils et non volatils ainsi que la génération de composés qui sont liés au goût (amertume, umami, douceur, acidité et salinité). Les molécules aromatiques appartiennent à des molécules de différentes classes chimiques tels que des : alcools, aldéhydes, cétones, acides gras, esters et composés soufrés (Smid and Kleerebezem, 2014). Leurs précurseurs sont fournis par un complexe processus, dans lequel trois grandes voies cataboliques sont impliquées : glycolyse, lipolyse et protéolyse (Yvon and Rijnen, 2001).

Le processus de formation d'arômes peut être séparé en deux sous-processus : (a) la génération de précurseurs, et (b) la conversion des précurseurs des composés aromatiques. Ces deux processus n'ont pas toujours lieu dans le même compartiment. Ainsi, si les précurseurs ne sont pas synthétisés par les microorganismes, mais plutôt sont puisés dans la

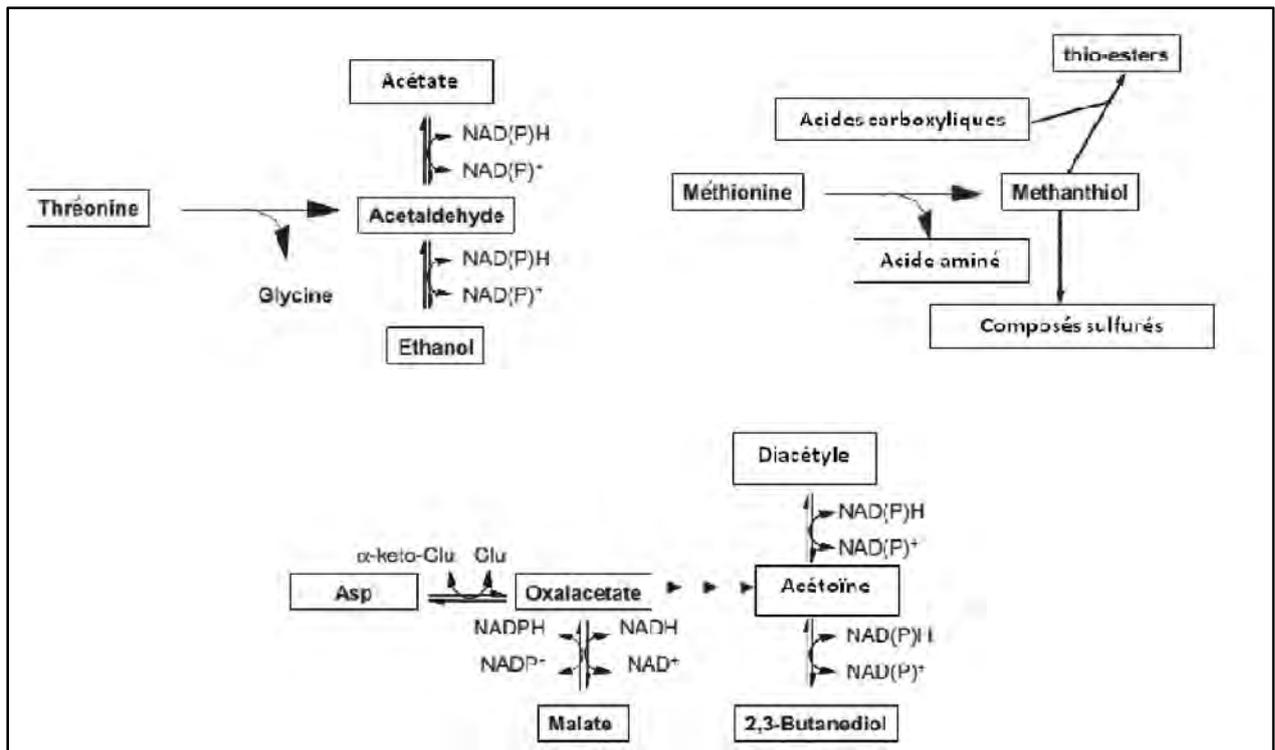


Figure 17: Conversion des acides aminés ; voies de formation des composés aromatiques (Ardö, 2006). Exemples de la thréonine, de la méthionine et de l'acide aspartique.

matrice alimentaire, la première partie du procédé est opérationnelle à l'extérieur de la cellule et dépend des enzymes endogènes, des enzymes sécrétées, et des enzymes de la lyse cellulaire (figure 17). Les étapes suivants ce processus s'appuient sur le transport des précurseurs dans la cellule et leurs conversions intracellulaires (Smid and Kleerebezem, 2014).

Les lactobacilles homofermentaires produisent des taux élevés de diacétyle, d'acétaldéhyde et d'hexanal, alors que les lactobacilles hétérofermentaires synthétisent l'acétate d'éthyle, des alcools et des aldéhydes. Les levures produisent de l'acétate d'éthyle et des isoalcools tels que le 2-méthyl-1-propanol, le 3-méthylbutanol, le 2,3-méthyl-1-butanol, et le 2-phényléthanol (Kamal-Eldin, 2012b). L'acide acétique, l'acide butanoïque, l'acide phénylacétique, les acides 2 et 3-méthylbutanoïque et l'acide pentanoïque sont des composés d'arôme importants formés pendant la fermentation au levain traditionnel (Czerny and Schieberle, 2002).

Par ailleurs, les réactions de Maillard jouent un rôle important dans l'appréciation de la qualité aromatique des céréales fermentées. Les composés volatils générés par ces réactions sont intéressantes en raison de leur saveur typique et leur puissance odorante (Van Boekel, 2006; Gänzle, 2014).

4.2.4 Vitamines et minéraux

Le microbiote des céréales fermentées est en mesure d'améliorer le contenu et la biodisponibilité d'un certain nombre de vitamines, notamment les vitamines du groupe B ; thiamine (B1), riboflavine (B2), acide pantothénique (B5), pyridoxal (B6), biotine (B7) et cyanocobalamine (B12). En effet, (Ekinci, 2005) a rapporté une augmentation significative des vitamines B2, niacin, B5, acides ascorbique et folique dans le *tarhana*, un aliment fermenté à base de céréales d'origine turque. La fermentation fournit aussi des conditions de pH optimales pour la dégradation enzymatique des phytates présentes dans les céréales et formant des complexes avec les protéines et les cations tels que le fer polyvalent, le zinc, le calcium, le magnésium. Une telle réduction des phytates peut augmenter les quantités de fer soluble, de zinc et de calcium de façon significative (Kamal-Eldin, 2012b).

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1: ENQUETE ET REPRODUCTION DU NOUVEAU PROCEDE DE FERMENTATION

Le blé fermenté *lemzeiet*, fait partie des habitudes alimentaires de différentes régions en Algérie pour la fabrication du couscous *lemzeiet* ; appellation spécifique dans l'est algérien. Ce type de couscous est très apprécié et particulièrement recherché dans cette région. L'enquête sur la qualité et le procédé de fabrication du couscous traditionnel *lemzeiet*, à partir de blé fermenté dans le *matmor* (Bekhouche *et al.*, 2013), a permis de découvrir l'émergence d'un nouveau procédé de fermentation rapide non contrôlée, où le blé est directement immergé dans l'eau dans des ustensiles de différentes formes. Afin d'étudier ce nouveau produit, notre première démarche est de réaliser une enquête prospective et la reproduction expérimentale de ce nouveau procédé.

1.1 Enquête

1.1.1 Objectif

Cette investigation vise à recueillir les informations relatives aux nouvelles conditions de fermentation du blé, et à rassembler le maximum d'informations sur la consommation et le mode de fermentation du blé selon le nouveau procédé.

1.1.2 Matériel

Le support de l'enquête, est un questionnaire (annexe 1) élaboré sur la base de l'enquête déjà réalisée sur le blé fermenté dans le *matmor* (Bekhouche *et al.*, 2013). Il est conçu autour des éléments suivants :

- **Informations sur les personnes à enquêter** : âge, sexe, origine et activité professionnelle ;
- **Description du procédé** : cette partie comprend la description de la matière première et du matériel utilisé, ainsi que le procédé et les paramètres physico-chimique qui conditionnent la fermentation ;
- **Caractéristiques et traitement du blé obtenu après la fermentation** : cette section vise à recueillir les informations sur l'aspect, la couleur, l'odeur du blé et la nature du produit final consommé.

1.1.3 Lieu et période de l'investigation

Ce travail est réalisé au niveau de 9 communes des wilayas de : Constantine, Mila, Oum el Bouaghi et Khenchela, connues par les cultures céréalières. L'enquête est effectuée en 2010 durant trois mois (mars, avril, mai). Elle cible les artisans et les commerçants des produits céréalières et des aliments traditionnels au niveau des marchés des communes citées ci-dessus.

1.1.4 Résultats

a) Caractéristiques des personnes interviewées

Ce procédé a été développé par les artisans et les vendeurs des produits alimentaires traditionnels. Les personnes questionnées sont toutes de sexe masculin, travaillant dans le secteur agricole ou commercialisant les produits céréalières (tableau 6).

Tableau 6 : Effectif des personnes questionnées

Wilaya	Commune	Age (ans)	A	B	C	Total
Constantine	<i>Constantine</i>	28-60	4	15	0	19
	<i>Zighoud Youcef</i>	45	1	0	0	1
Mila	<i>Chelghoum</i>	30-45	1	5	0	6
	<i>Laid</i>					
	<i>Ferdjioua</i>	40-46	0	2	0	2
Oum El Bouaghi	<i>Oum El</i>	32-60	0	0	0	0
	<i>Bouaghi</i>					
	<i>Ain Kercha</i>	30-40	1	0	5	6
	<i>Sigus</i>	47-56	0	1	1	2
Khenchela	<i>Khenchela</i>	32-55	0	0	10	10
Total			7	23	16	46

^A personnes pratiquant le nouveau procédé de fermentation.

^B personnes niant l'existence du nouveau procédé et/ou le reconnaissant de façon méfiante.

^C personnes ne connaissant que le procédé traditionnel de fermentation dans le *matmor*.

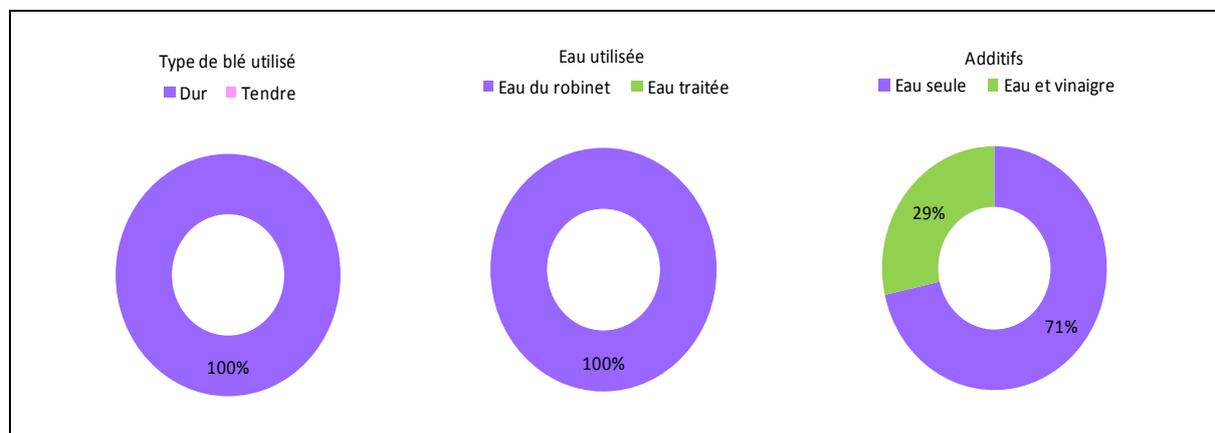


Figure 18 : Matière première et additifs utilisés.

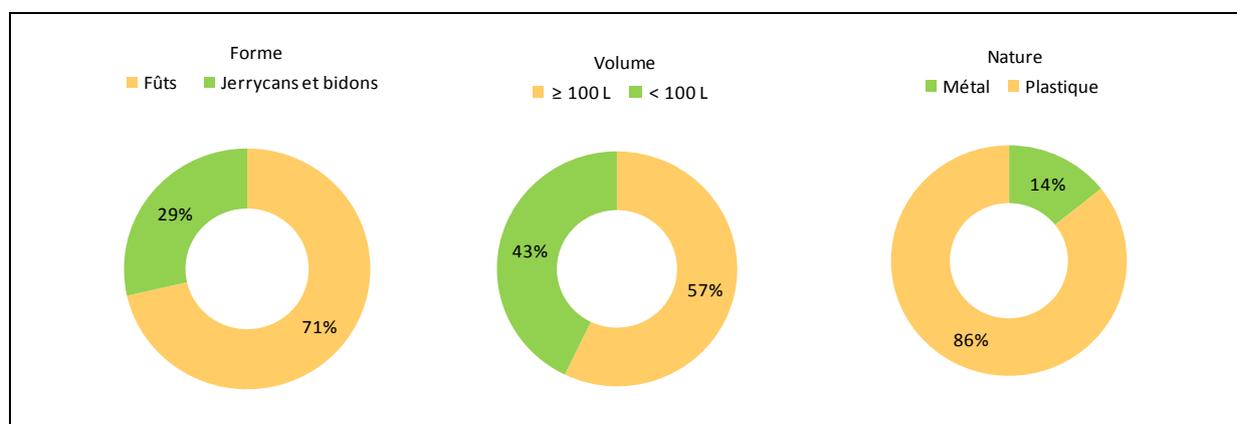


Figure 19: Matériel utilisé dans la fermentation.

b) Description du procédé

Afin de dresser une fiche technique du nouveau procédé de fermentation, nous avons réalisé une analyse descriptive après le groupement et le classement des principales données obtenues. Il ressort de cette enquête, les principaux éléments suivants :

• Matière première et matériel utilisé dans la fermentation

Le blé dur mélangé à l'eau, constitue la matière première de ce procédé. L'eau utilisée, de distribution, ne subit aucun traitement au préalable. Néanmoins, certains artisans (29%) décrivent l'existence d'une autre pratique, qu'est l'ajout de vinaigre au mélange blé/eau à raison de 2,5 L/100 kg, afin d'accélérer l'affinage du blé fermenté (figure 18). La fermentation est généralement réalisée dans des ustensiles de différentes formes et tailles, majoritairement en matière plastique (86%). Les fûts sont les plus utilisés (71%) (figure 19).

• Procédé et paramètres physico-chimiques qui conditionnent la fermentation

Les résultats montrent que les artisans pratiquent cette nouvelle méthode de fermentation du blé de façons très simple et spontanée. Le blé occupe, plus ou moins, le tiers de la capacité du matériel de fermentation. Il est directement immergé dans l'eau, où le niveau de l'eau dépasse celui du blé de 5 à 10 cm. La fermeture du procédé n'est pas souvent respectée (14%). Quand elle est présente elle est assurée par des couvercles avec ou sans vis.

Une fois le procédé mis au point, les jerrycans sont incubés à des températures fluctuantes selon les saisons. Cette incubation s'échelonne entre 3 et 12 mois, mais peut également dépasser cet intervalle chez certains artisans (14%) (figure 20).

• Description et traitement du blé obtenu après fermentation

A la fin de la période de fermentation le volume de l'eau diminue considérablement et les grains de blé demeurent humides. Le blé fermenté, de goût acide et de couleur marron clair à foncé, subit une étape de séchage de plusieurs jours à l'aire libre. Le blé sec ainsi obtenu est finement moulu. La semoule obtenue est destinée principalement à la fabrication de couscous *lemzeiet* (80%) et secondairement à l'élaboration de galettes de blé fermenté (20%). Il est important également de mentionner que le terme « *lemzeiet* » est utilisée à la fois pour nommer le couscous et la forme brute du blé fermenté (figure 21).

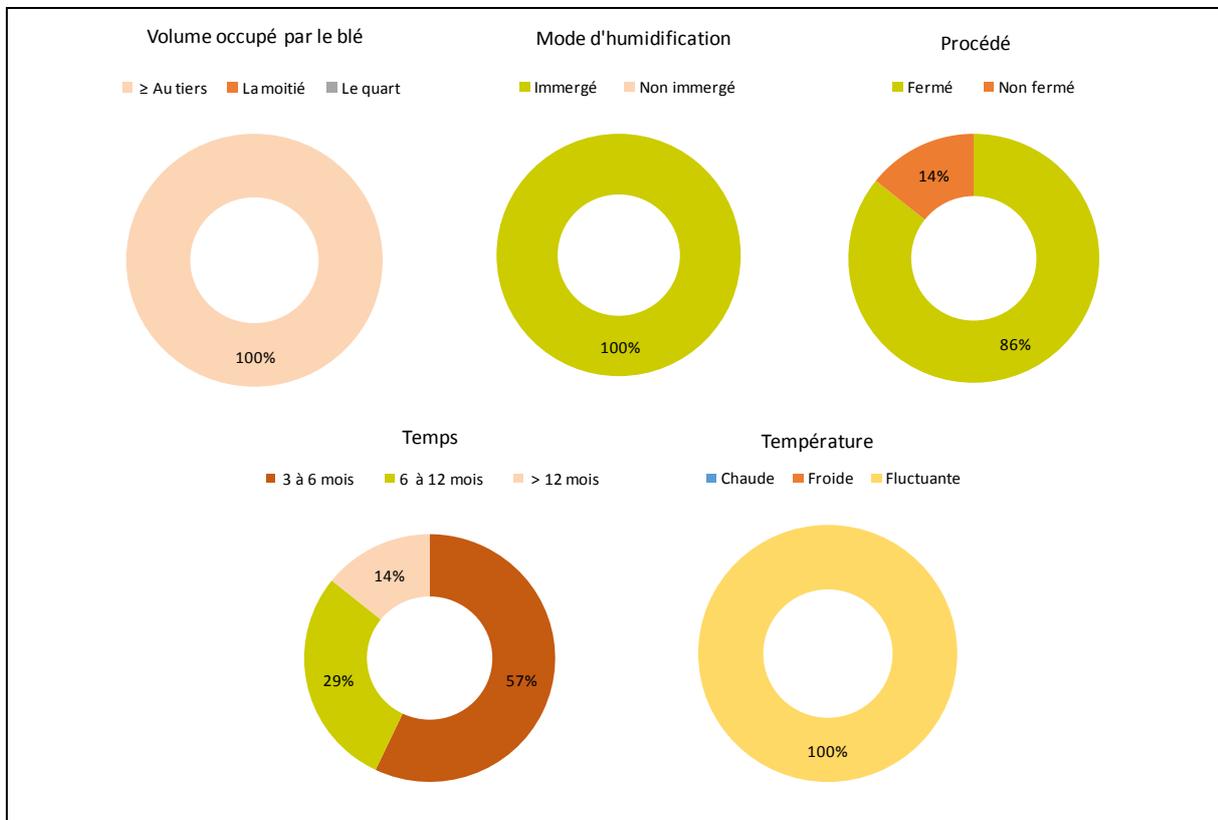


Figure 20: Conditions de la fermentation

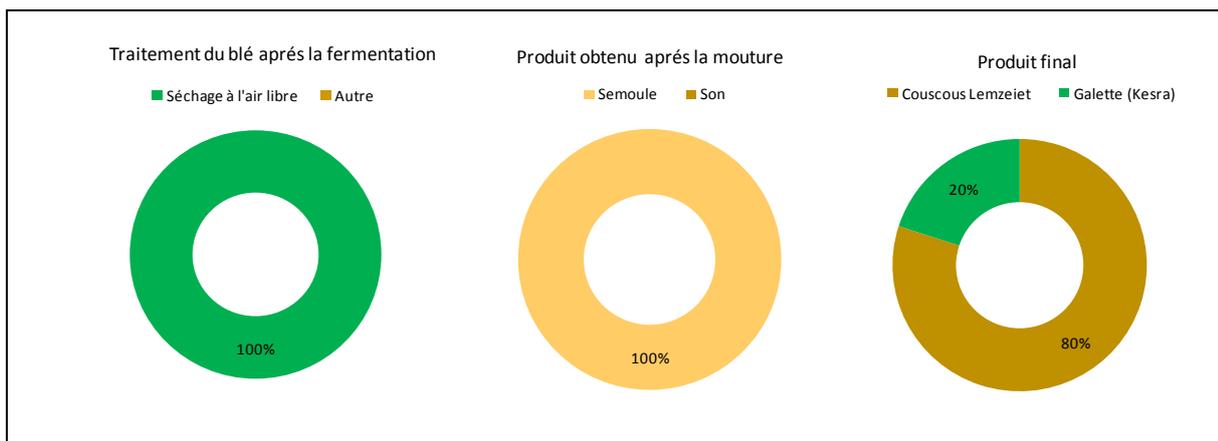


Figure 21: Traitement du blé après la fermentation

1.1.5 Discussion

Le procédé de fermentation du blé à l'extérieur du *matmor* a été développé par les artisans et les commerçants des produits céréaliers et traditionnels, pour répondre à la demande des consommateurs. Ceci est dû à un manque considérable du blé fermenté, suite à l'abandon progressif de la fermentation traditionnelle dans le *matmor*. L'évolution du mode de vie, l'exode rural et la généralisation des méthodes modernes de stockage de blé ont également contribué à l'émergence de ce nouveau procédé.

Le but initial de cette enquête était d'évaluer l'importance et l'étendu de ce nouveau procédé chez les pratiquants ainsi que de recueillir les informations nécessaires à sa reproduction expérimentale. Malheureusement, les personnes impliquées dans l'élaboration de ce nouveau procédé de fermentation, n'étaient pas dans la plupart du temps coopératives. En effet, ce procédé est effectué de façon clandestine à l'insu des consommateurs et des autorités de contrôle concernées.

1.1.6 Conclusion

L'analyse des principaux résultats a montré que la fermentation du blé est réalisée de façon non contrôlée. La température est tributaire des fluctuations saisonnières et l'anaérobiose n'est pas toujours respectée. Certains producteurs utilisent le vinaigre comme additif en début de fermentation. La durée de l'affinage varie d'un fabricant à l'autre ; elle est en moyenne de 6 à 12 mois. Il est également important de noter que les artisans n'accordent pas un intérêt particulier à l'aspect sanitaire du produit.

1.2 Reproduction expérimentale du procédé de fermentation

1.2.1 Matériels et méthodes

a) *Origine du blé*

Dans cette étude nous avons utilisé quatre-vingts kilogrammes de blé dur (*Triticum durum* : variété locale Mhamed Ben Bachir), issus de la récolte de 2010 et provenant de l'OAIC (Office Algérien Interprofessionnel des Céréales, Sétif- Algérie).

b) *Etapas et conditions de fermentation*

Deux fermentations du blé, avec addition initiale de vinaigre (V) et sans vinaigre (E), sont reproduites à l'échelle du laboratoire dans des jerrycans en plastique de 10 litres. Nous

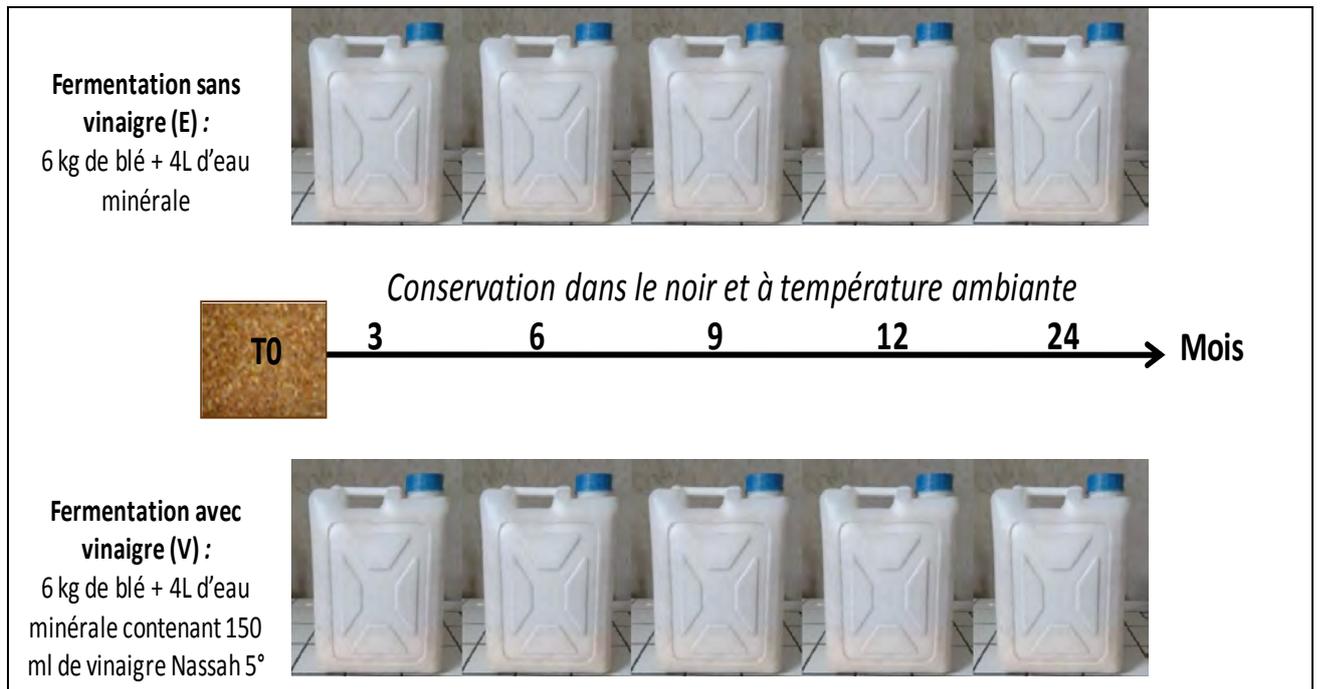


Figure 22: Mise en place de la fermentation du blé dans les jerrycans en plastique.

avons choisi de modifier le procédé décrit par les artisans en utilisant de l'eau minérale, en scellant les jerrycans pour créer l'anaérobiose et en incubant à l'abri de la lumière. Ceci est dans le but de se rapprocher des conditions de fermentation traditionnelle dans le *matmor*, non prises en considération par les artisans. La température ambiante peut varier de 20 à 40 ° C.

c) Model expérimental

Afin de se placer dans des conditions reproductibles, qui reflètent la réalité actuelle de la transformation du blé et potentiellement transférable à l'échelle semi- industrielle, le blé va subir une fermentation durant 24 mois (de février 2011 à février 2013). 12 jerrycans de capacité de 10 litres sont utilisés pour la mise en place du procédé (figure 22) :

- 6 jerrycans pour la fermentation V et 6 pour la fermentation E;
- Pour les deux types de fermentations, 4 l d'eau et 6 kg de blé sont mis dans chaque jerrycans ;
- Pour la fermentation V, 150 ml de vinaigre 5° (Nassah) sont ajoutés dans chaque jerrycans ;
- Les jerrycans sont fermés et scellés, en déposant une couche de silicone sanitaire au niveau de la bordure externe du couvercle à vis, de façon à créer l'anaérobiose totale, puis laissé fermenter à l'obscurité dans une armoire fermée.
- Le blé non-fermenté (T0), est considéré comme témoin ;
- Seuls 5 jerrycans de chaque fermentation (E et V) sont utilisés dans la présente étude. Les jerrycans restants feront l'objet de travaux de recherche d'autres thèses en cours.

d) Echantillonnage

Les échantillons de blé fermenté durant 24 mois sont récupérés, à des intervalles réguliers, tous les trois mois. A chaque période, deux jerrycans des fermentations E et V sont ouverts aseptiquement à l'aide d'un couteau métallique stérilisé. Les jerrycans sont ouverts, en coupe longitudinale, de façon à observer l'évolution du gradient de modification du blé (figure 23). Les échantillons de blé fermenté (500 g) sont prélevés, dans des sacs en plastiques propres, à partir de la surface et à partir du mélange après homogénéisation du contenu. Ils sont ensuite conservés au frais pour les analyses microbiologiques et physico-chimiques qui vont suivre.

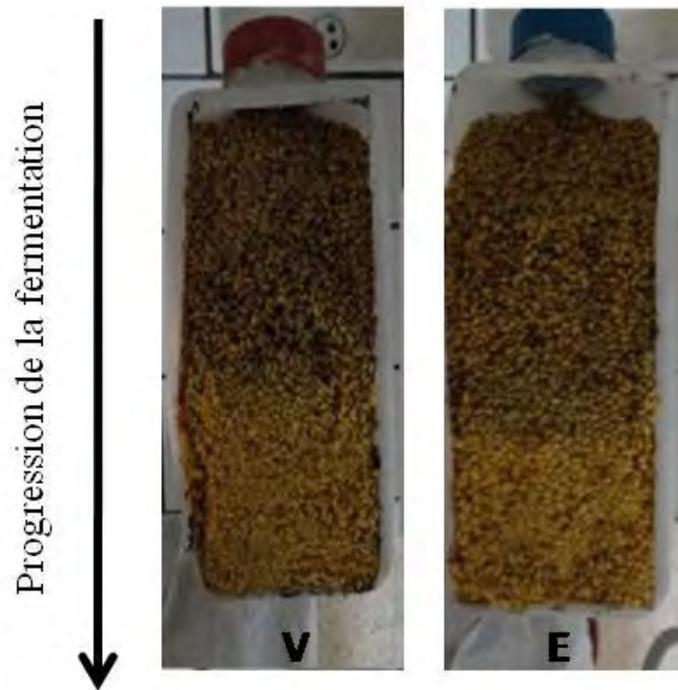


Figure 23 : Effet graduel de la fermentation après 3 mois.



Figure 24 : Aspect macroscopique du blé après 12 mois de fermentation (observations à la loupe binoculaire).

(E) blé fermenté sans vinaigre ; (V) blé fermenté avec vinaigre.

1.2.2 Résultats

La coupe longitudinale montre que le blé fermenté a deux aspects : dans la partie supérieure des jerrycans les grains sont de couleur marron, qui s'intensifie au cours de l'affinage. Dans l'autre partie, en profondeur, la couleur des grains n'est pas modifiée ; ils ont toujours leur couleur initiale. Le changement de l'aspect commence en surface et va progressivement en profondeur (figure 24). Les grains de blé sont mous, dilatés de forme ovale aplatie. Ceux de couleur marron, ont un aspect brillant et huileux notamment aux stades avancés de l'affinage. Nous avons noté également la présence d'odeur acide et la présence, dans certains jerrycans, de moisissures de couleur blanchâtre au niveau de la surface.

Les échantillons E et V sont, visuellement, similaires. La seule différence entre les deux types d'échantillons réside au niveau de la couleur des grains de blé. Les échantillons V ont une couleur marron, plus foncée que les échantillons E au même stade de l'affinage. Tous les échantillons T0, V (V3, V6, V9, V12, V24) et E (E3, E6, E9, E12, E24), prélevés à partir du mélange durant les 24 mois, sont présentés dans la figure 25.

1.2.3 Discussion

La fermentation du blé a provoqué des changements profonds de la matière première. Ces changements ont affecté les caractéristiques physiques du blé. La qualité et la vitesse de l'évolution de ces modifications sont déterminées par la disponibilité des sucres fermentescibles et la présence de nutriments essentiels pour la croissance microbienne, notamment les protéines comme source essentielle d'azote (Iwański *et al.*, 2012). Les grains de blé dur, par leur richesse en amidon et leur teneur en protéines d'environ 10 % (Saulnier, 2012), constituent une niche écologique favorable au développement des microorganismes en présence des conditions favorables (anaérobiose, température adéquate et humidité).



a : blé fermenté sans addition de vinaigre (E)



b : blé fermenté avec addition de vinaigre (V)

Figure 25 : Echantillons de blé fermenté (mélange) durant 3, 6, 9, 12 et 24 mois.

(T0) blé non-fermenté.

1.2.4 Conclusion

Afin d'étudier la fermentation du blé, l'ensemble des 11 échantillons prélevés (figure 25) feront l'objet d'analyses microbiologiques et physico-chimiques. L'objectif est de caractériser la flore qui est à l'origine des modifications apportées aux échantillons E et V et de déterminer l'impact de cette flore sur la composition de la matrice du blé fermenté. Nous allons également étudier les profils des composés aromatiques et des acides aminés libres des différents échantillons.

CHAPITRE 2: EVALUATION ET CARACTERISATION DU MICROBIOTE DU BLE FERMENTE

La composition et la diversité du microbiote des aliments fermentés à base de céréales dépendent principalement du procédé technologique et de l'adaptation des microorganismes aux écosystèmes fermentaires. Les aliments fermentés à base de céréales abritent divers microorganismes, en association ou non, qui comprennent les BL, les levures et les champignons filamenteux, présents sur les matrices de fermentation (Guyot, 2010). La plupart des céréales fermentées comportent une phase de fermentation menée par les BL, qui peut être associée à une autre étape de fermentation alcoolique par les levures. Les champignons filamenteux sont relativement limités, mais sont présents dans certains produits et boissons fermentées d'origines asiatiques (Jespersen, 2003; Guyot, 2010; Tamang, 2010a).

Afin de décrire les communautés microbiennes présentes dans le blé fermenté (champignons filamenteux, levures et BL) au cours des 24 mois de fermentation, les 11 échantillons précédemment prélevés (T0, E3, E6, E9, E12, E24, V3, V6, V9, V12 et V24) sont analysés par les méthodes microbiologiques culturelles classiques.

2.1 Matériels et méthodes

2.1.1 Isolement et dénombrement de la flore fongique

L'isolement et le dénombrement de la flore fongique sont réalisés à partir de 20 g, de chaque échantillon de blé fermenté, ajoutés à 180 ml de solution stérile de Tween 80 à 0.5% (v/v). Après homogénéisation avec le Stomacher lab-blender pendant 2 min à vitesse maximale, une série de dilutions décimales (jusqu'à 10^{-6}) est ensuite préparée (NF V18-301). 100 μ l de chaque dilution sont étalés sur la surface du milieu gélosé Malt agar (Biokar Diagnostics). L'incubation est à 25°C pendant 2-10 jours avec une observation quotidienne de l'aspect macroscopique et microscopique des isolats. Des préparations, fixées au lactophénol, sont examinées au microscope optique. L'identification est basée sur les clés de détermination des moisissures décrites par Botton (1990).

Pour l'isolement de la flore fongique, nous avons choisi de l'effectuer à partir des échantillons E et V, prélevés du mélange et de la surface du blé fermenté.

2.1.2 Isolement et dénombrement de la flore lactique

L'emploi d'un seul milieu standardisé, risque d'être peu significatif. De ce fait, nous avons choisi de réaliser l'isolement sur 3 milieux de cultures différents :

- Man Rogosa Sharpe (MRS ; pH 5,7), comme milieu riche et spécifique des BL (Schillinger and Holzapfel, 2011) ;
- MRS acidifié (pH 5,4) pour favoriser la croissance des BL adaptées aux conditions acides générées par la fermentation ;
- Brain Heart Infusion (pH 7,4) additionné de 1% (w/v) d'extrait de levure (BHIYE) ; un milieu non sélectif riche destiné à la culture de la plupart des bactéries anaérobies et d'autres microorganismes exigeants (Corry *et al.*, 2011). Ce milieu additionné d'extrait de levure a été testé et utilisé, au CIRM- BIA (UMR 1253-STLO, Rennes France) pour l'isolement et la culture des BL.

L'isolement de la flore lactique est réalisé, seulement, à partir des échantillons E et V prélevés du mélange. 10 g de chaque échantillon sont ajoutés à 90 ml d'eau tryptonée à 1% (w/v) et homogénéisés avec le Stomacher lab-blender pendant 2 min à vitesse maximale. Une série de dilutions décimales (jusqu'à 10^{-6}) est réalisée. 0,1 ml de la suspension microbienne est stérilement déposée à la surface des géloses : MRS, MRS acidifié et BHIYE (Biokar Diagnostics). Les dilutions sont soigneusement réparties sur la surface puis incubées à 30 °C dans les conditions d'aérobie et d'anaérobie pendant 48–72 h. L'anaérobiose est créée par le biais d'anaérocult (Anaerocult® AMerck, Germany) en jarre d'anaérobiose. L'anaérobiose est contrôlée par des bandelettes indicatrices (anaérottest).

- **Purification et sélection présomptive des BL** : pour avoir le maximum de diversité possible et réaliser les premiers tests d'orientation, à partir des boîtes des dilutions les plus élevées, nous avons sélectionné les colonies selon leur aspect macroscopique et avons choisis aléatoirement les colonies supposées représentatives. Chaque colonie sélectionnée est purifiée deux fois par isolement sur les milieux MRS, MRS (pH 5.4) et BHIYE.

Pour l'identification présomptive des BL, des observations macroscopiques et microscopiques à l'état frais (Nikon optiphot à contraste de phase), sont réalisées. Seules les cellules non mobiles, ayant des formes caractéristiques des BL (coques ou bacilles), sont retenues pour les analyses ultérieures.

- **Conservation des BL** : des cultures pures issues des repiquages sont stockées à -80°C (cryotubes 1,5 ml) dans le milieu MRS ou BHIYE contenant le glycérol (1/1) à 30% (v/v).

2.2 Résultats

2.2.1 Flore fongique

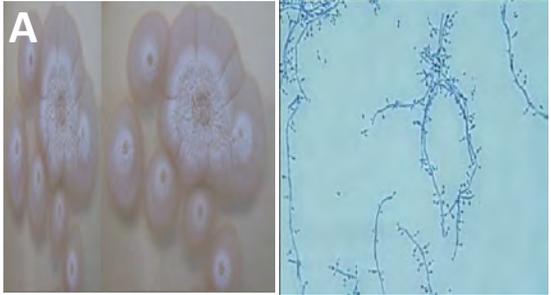
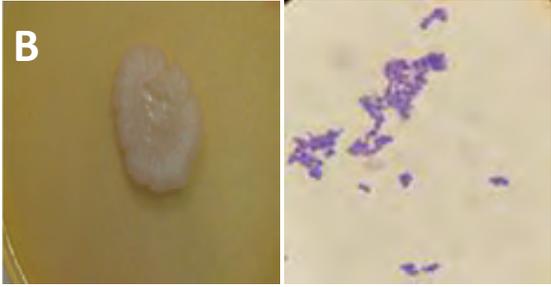
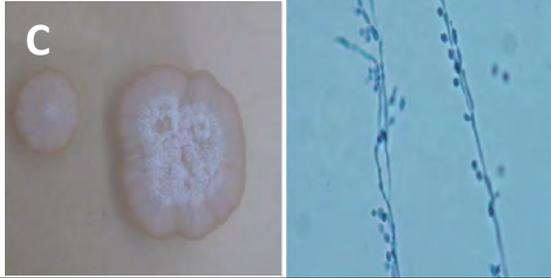
Les dénombrements des levures et les champignons filamenteux présents avant la fermentation sont respectivement de 3,5 et 2,5 log UFC g⁻¹. A partir du 3^{ème} mois de fermentation, ils sont pratiquement non détectables. En effet, les quelques échantillons positives aux dénombrements sont ceux prélevés à partir de la surface. Par ailleurs, ceux du mélange (ou qui se trouvent en profondeur) sont caractérisés par l'absence totale des levures et des champignons filamenteux (tableau 7). L'identification, basée sur les caractéristiques macroscopiques et microscopiques, des différentes colonies isolées est mentionnée dans les tableaux 8 et 9.

Tableau 7 : Dénombrements des champignons filamenteux et des levures dans les échantillons E et V exprimés en log UFC g⁻¹.

Flore fongique	Temps de fermentation (mois)					
	0	3	6	9	12	24
<i>Echantillons (E)</i>						
Champignons filamenteux ^(S)	-	nd	nd	≤ 2	nd	nd
Champignons filamenteux ^(M)	2,5	nd	nd	nd	nd	nd
Levures ^(S)	-	5,2	≤ 2	nd	nd	nd
Levures ^(M)	3,5	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Echantillons (V)</i>						
Champignons filamenteux ^(S)	-	nd	4,6	nd	nd	nd
Champignons filamenteux ^(M)	2,5	nd	nd	nd	nd	nd
Levures ^(S)	-	nd	4,6	≤ 2	nd	nd
Levures ^(M)	3,5	nd	nd	nd	nd	nd

^(S) Surface ; ^(M) Mélange ; ^(nd) non détecté ; (E) blé fermenté sans vinaigre ; (V) blé fermenté avec vinaigre.

Tableau 8 : Description des différentes colonies fongiques isolées (culture à 27°C pendant 7j).

Origine	Description macroscopique sur Malt Agar	Description microscopiques et identification	Aspects macroscopique et microscopique (X40)
E3 et E6	<p>Bordure festonnée Blanchâtre, crème au centre Revers pâle, anneau jaunâtre, pourtour beige Présence de quelques rayons avec 2 zones :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Zone périphérique relativement lisse, nacré - Zone centrale plus sporulée, plissée, couverte d'un "velour" de spores blanc, centre crémeux 	<p>Présence d'éléments filamenteux (1,5 µm) Bourgeonnement directement à partir de l'hyphe ou latéral à partir d'une structure oblongue plus ou moins triangulaire (1 x 3,5-4,7 µm) Spores (1,3-1,9 x 1,2-1,3µm) Structures +/- complexes => levure filamenteuse</p>	
E3	<p>Colonie uniforme, relativement ronde Blanc nacré Revers jaune pâle Zone centrale plus translucide Légèrement en dépression</p>	<p>Bourgeonnement Très peu d'éléments filamenteux => levure</p>	
V6	<p>Colonie relativement ronde Blanc, blanc-crème Revers jaune 2 zones :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Zone périphérique brillante, irrégulière en surface, présence de petits "pics" d'où émergent des micro-mèches - Zone centrale plus sporulée, bosselée 	<p>Présence d'éléments filamenteux Présence de bourgeonnement => levure filamenteuse</p>	

(E) blé fermenté sans vinaigre ; (V) blé fermenté avec vinaigre.

Suite du tableau 8 : Description des différentes colonies fongiques isolées (culture à 27°C pendant 7j)

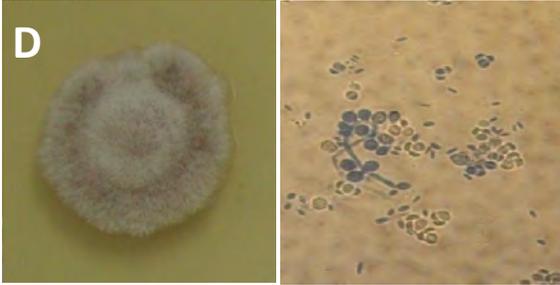
<p>V9</p>	<p>Colonie brillante, à bords festonnés, de couleur blanche qui devient rosée en vieillissant Revers marron. Très sporulée. Présentant des filaments formant des mèches</p>	<p>Présence de plusieurs structures de taille et de forme différentes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - petites structures allongées s'agencant de part et d'autre d'une structure filamenteuse (colorées en bleu) (spores) - structures plus grosses, globeuses (coloration bleue) qui s'organisent, se divisent et finissent par donner des éléments réniformes (décolorés). Ces structures font penser à des ascospores. <p>=> levure filamenteuse</p>	
<p>V6</p>	<p>Colonie relativement ronde, blanche Aspect poudreux revers jaune-marron Extrêmement sporulée en totalité (même les mèches) En périphérie : fasciculation de mèches</p>	<p>Filaments septés Eléments type arthrospore avec cicatrices latérales Spores globuleuses à piriformes unicellulaires pouvant être en chaîne Chlamydo-spores unicellulaires bien différenciées avec paroi nette => <i>Moniliella acetoabutens</i></p>	
<p>E9</p>	<p>Croissance lente Structure plus serrée, fasciculée en périphérie Surface ridée, zonée, très sporulée Verte, marge fine blanche Revers crème Exsudat absent Odeur agréable, sucrée</p>	<p>Pinceaux monoverticillés (1 étage) avec souvent une branche Conidiophores renflés à l'extrémité (en forme de vésicule) paroi lisse Phialides nombreuses, relativement larges, lancéolées à l'extrémité Spores elliptiques quand jeunes puis devenant globeuses, à paroi lisse Très longues chaînes de spores => <i>Penicillium fellutanum</i></p>	

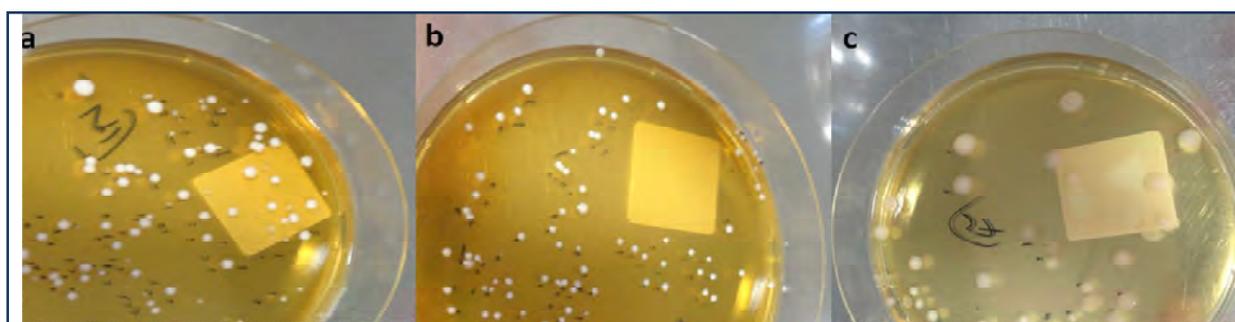
Tableau 10 : Dénombrements de la flore lactique, mésophile aéro/anérobies, des échantillons E et V exprimés en log UFCg⁻¹.

Milieux de culture	Temps de fermentation (mois)					
	0	3	6	9	12	24
Echantillons (E)						
MRS	*	4,6	1,9	nd	5,1	2,4
MRS (pH 5,4)	*	4,6	1,6	nd	4	2,5
BHIYE	*	4,5	1,6	nd	4,6	2,3
Echantillons (V)						
MRS	*	4,2	1,6	2	2,1	*
MRS (pH 5,4)	*	3,6	*	1,6	1,9	*
BHIYE	*	4,1	1,9	2,5	2	2,3

(*) Dénombrement inférieur à 10 UFC g⁻¹; (nd) Non détecté; (E) blé fermenté sans vinaigre; (V) blé fermenté avec vinaigre.



Echantillons V



Echantillons E

Figure 26 : Aspects macroscopiques des colonies sur les 3 milieux : a ; MRS acidifié, b ; MRS et c ; BHIYE (cultures de 72h à 30°C).

Tableau 9: Champignons filamenteux isolés du blé avant et après fermentation.

Espèces isolées	
Avant fermentation (T0)	<i>Alternaria.sp</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i> <i>Cladosporium herbarum</i> <i>Penicillium canescens</i>
Après fermentation (E et V)	<i>Moniliella acetoabutens</i> (V6) <i>Penicillium fellutanum</i> (E9)

(E) ; blé fermenté sans vinaigre ; (V) blé fermenté avec vinaigre.

2.2.1 Flore lactique

Les dénombrements des BL mésophiles aéro - anaérobies sur MRS, MRS (pH 5,4), et BHIYE ne diffèrent pas de plus à 0,5 log UFC g⁻¹. Il est en dessous de 10 UFC g⁻¹ dans le blé non-fermenté et atteint, au cours du processus de fermentation, des valeurs maximales de 4,2 et 5,1 log CFU g⁻¹, respectivement, dans le blé fermenté avec et sans vinaigre (tableau 10 et figure 26).

Sur la base des caractéristiques macroscopiques et microscopiques, 147 isolats de BL sont sélectionnés à partir des échantillons E et V. A l'aide des comparaisons morphologiques des cellules au microscope à contraste de phase, 69 sont retenus pour la caractérisation moléculaire. 44 des isolats appartiennent aux échantillons V et sont majoritairement des lactocoques. A partir des échantillons E 22 isolats sont sélectionnés, réparties entres lactobacilles et lactocoques. 3 isolats sont issus de l'échantillon de blé non-fermenté (T-190, T-191 et T-192) (tableau 11).

Tableau 11: Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des 69 isolats sélectionnés.

Isolats	Milieu ^(*)	Aspect et couleur de la colonie	Aspect de la culture en bouillon ^(**)	CO ₂	Mobilité	Forme des cellules
E3-63	MRS-An	Petit, gris beige	Petit culot + trouble léger	-	-	Bacilles droits fins isolés, par deux ou en chaînes
E3-65	BHIYE-Ae	Blanche, petite centre en dôme	Petit culot + trouble léger	-	-	Coques par 2, quelques petites chaînes
E3-66	BHIYE-Ae	Blanche petite centre en dôme	Petit culot + trouble léger	-	-	Coques par 2, quelques petites chaînes
E3-67	MRS-Ae	Petite transparente	Petit culot + trouble léger	-	-	Coques par 2, quelques petites chaînes
E3-68	MRS-Ae	Blanche, crémeuse	Petit culot + trouble léger	-	-	Petits coques réfringents isolés ou par 2
E3-70	MRSA-Ae	Petite, claire	Petit culot + trouble intense	+	-	Petits coques par 2 isolés ou en chaînes
E3-73	MRSA-Ae	Blanche, bombée	Gros culot + trouble intense	-	-	Petits coques réfringents ronds par 2, en tétrades ou petites chaînes
E3-76	MRSA-Ae	Petite, transparente	Gros culot + trouble intense	-	-	Petits coques ronds réfringents par 2 ou en tétrades
E3-77	MRS-Ae	Petite, marron gris	Gros culot + trouble léger	-	-	Coques ovoïdes en longues chaînes
E6-120	MRS-Ae	Plate centre en dôme, contour irrégulier	Culot moyen+ trouble léger	-	-	Petits bacilles isolés ou par 2
E6-121	MRS-An	Plate centre en dôme, contour irrégulier	Culot moyen+ trouble léger	-	-	Petits bacilles isolés ou par 2
E12-1	BHIYE-An	Petite, contour régulier, plate	Petit culot +trouble intense	+	-	Bacilles longs et fins isolés + bacilles courts
E12-2	BHIYE-Ae	Très petite	Petit culot net + trouble léger	+	-	Bacilles longs et fins isolés + bacilles courts
E12-3	BHIYE-Ae	Très petite	Petit culot net +trouble léger	+	-	Bacilles courts isolés ou par 2 quelques formes plus longues
E12-8	BHIYE-Ae	Petite, contour régulier, bombée	Gros culot net + trouble léger	+	-	Bacilles longs et courts assez gros isolés ou par deux
E24-160	MRSA-An	Blanche	Gros culot+trouble intense	-	-	Coques réfringents par 2 ou en tétrades
E24-162	MRSA-An	Petite, transparente	Gros culot+trouble intense	+	-	Bacilles moyens isolés ou par 2 parfois en amas
E24-164	MRS-Ae	Petite, transparente	Petit culot+trouble léger	-	-	Bacilles fins isolés ou par 2, assez grands
E24-168	MRS-An	Blanche, crémeuse	Culot moyen+ trouble intense	-	-	Petits coques par 2 ou en amas
E24-169	MRS-An	Petite, plate, marron	Culot moyen+ trouble intense	+	-	Longs bacilles fins isolés ou par 2
E24-171	MRSA-An	Petite, marron, transparente	Petit culot+ trouble intense	+	-	Bacilles longs, petits et moyens très fins isolés et en amas
E24-174	BHIYE-Ae	Petite, transparente	Culot moyen+ trouble léger	-	-	Bacilles fins isolés assez larges

^(*) incubé en aérobiose ou en anaérobiose à 30°C, les milieux utilisés sont ceux précédemment décrits dans la partie matériels et méthodes ; ^(**) Bouillon du milieu d'isolement ; (E) blé fermenté sans vinaigre ; (B) blé fermenté avec vinaigre ;(T0) blé non-fermenté.

Suite du tableau 11 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des 69 isolats sélectionnés.

Isolat	Milieu	Aspect et couleur de la colonie	Aspect de la culture en bouillon	CO ₂	Mobilité	Forme des cellules
V3-80	BHIYE-Ae	Petite, gris beige, contour irrégulier	Petit culot + trouble léger	-	-	Petits coques isolés ronds
V3-82	BHIYE-An	Petite, gris beige, centre en dôme, contour irrégulier	Culot moyen + trouble léger	-	-	Coques assez gros isolés ou par 2
V3-84	BHIYE-An	Très petite, transparente	Absence de culot+ trouble léger	-	-	Bacilles, tordus, isolés par 2 ou en chaînes
V3-85	MRS-An	Petite, marron beige	Petit culot+ trouble léger	-	-	Coques réfringents en amas ou en tétrades
V3-86	MRS-An	Blanche, bombée	Petit culot+ trouble intense	-	-	Coques réfringents isolés par 2 ou en tétrades
V3-91	MRS-Ae	Plate, beige	Culot moyen + trouble intense	+	-	Gros coques par 2 ou par chaînes assez longues
V3-92:	MRS-Ae	Blanche crémeuse	Culot moyen + trouble intense	-	-	Coques isolés ou par 2 réfringents
V3-95:	MRS-An	Plate, marron, brillante	Petit culot + trouble léger	-	-	Gros coques isolés par 2 ou 4
V3-96	MRS-An	Crémeuse, plate	Gros culot + trouble léger	-	-	Coques rondes réfringents par 2 ou en tétrades
V3-98	MRSA-Ae	Petite, transparente	Culot coupé + trouble intense	-	-	Coques rondes réfringents par 2 ou en tétrades
V3-99	MRSA-Ae	Blanche, crémeuse	Culot moyen + trouble intense	+	-	Petits bacilles courts par 2 ou isolés, réfringents
V3-100	MRSA-An	Petite, bordure claire et centre blanc	Petit culot + trouble intense	-	-	Coques par 2 ou en tétrades
V3-101	MRSA-An	Petite, bordure claire et centre blanc	Petit culot + trouble léger	-	-	Coques par 2 ou en petites chaînes
V3-103	MRSA-An	Plate, blanche	Petit culot + trouble intense	-	-	Coques ronds isolés ou par 2, réfringents
V6-110	MRS-Ae	Crémeuse, blanche	Petit culot net+ trouble léger	-	-	Coques par 2 ou 4, réfringents
V6-111	MRS-Ae	Plate, marron	Culot moyen+ trouble intense	-	-	Très petits coques isolés ou par 2, réfringents
V6-112	BHIYE-Ae	Plate centre en dôme	Petit culot net + trouble léger	-	-	Coques isolés ou par 2
V9-140	MRS-An	Plate, beige gris	Petit culot net+ trouble léger	-	-	Petits coques isolés ou par 2 (courtes chaînes) un peu réfringents
V9-141	MRS-An	Petite, transparente	Petit culot net+ trouble clair	-	-	Petits bacilles par 2 ou isolés, des fois en chaînes
V9-142	MRSA-An	Petite, transparente	Petit culot net+ trouble clair	-	-	Petits bacilles par 2 ou isolés des, fois enchaînés
V9-145	MRS-Ae	Petite, blanche	Gros culot+trouble intense	-	-	Petits bacilles en courtes chaînes, par 2 ou isolés ou en amas
V9-146	MRSA-Ae	Petite, blanche	Gros culot+trouble intense	-	-	Petits bacilles incurvés en courtes chaînes, par 2 ou en amas
V9-147	MRS-Ae	Grosse, plate, blanche	Gros culot+trouble intense	-	-	Petits coques par 2 ou courtes chaînes

Suite du tableau 11: Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des 69 isolats sélectionnés.

Isolat	Milieu	Aspect et couleur de la colonie	Aspect de la culture en tube	CO₂	Mobilité	Forme des cellules
V9-148	MRSA-An	Grosse, blanche, crémeuse	Gros culot+trouble intense	-	-	Petits bacilles par 2 courts et en petites chaînes
V9-149	MRSA-An	Blanche, crémeuse	Culot moyen+ trouble léger	-	-	Petits coques par deux ou en tétrades
V9-150	MRS-An	Blanche, petite	Gros culot+trouble intense	-	-	Coques par 2 ou en courtes chaînes
V9-152	BHIYE-Ae	Blanche, crémeuse	Gros culot+trouble intense	-	-	Coques par 2 ou en chaînes
V9-154	BHIEY-An	Petite, transparente	Gros culot+trouble intense	-	-	Coques par 2 ou en petites chaînes de 4
V9-156	BHIYE-An	Plate, marron	Petit culot+trouble léger	-	-	Coques réfringents isolés ou par 2 ou en chaînettes
V9-157	BHIYE-Ae	Contour régulier, plate	Culot moyen+ trouble léger	-	-	Petits coques par 2 ou en petites chaînes
V9-158	BHIYE-Ae	Contour irrégulier, plate	Petit culot+trouble léger	-	-	Gros coques ovoïdes isolés, par 2 en chaînes assez longues
V9-159	BHIYE-An	Blanche, plate, contour irrégulier	Petit culot+trouble léger	-	-	Très petits coques réfringents isolés, par 2, quelques chaînes de 4
V9-200	MRS-Ae	Grosse, plate, blanche	Gros culot+trouble intense	-	-	Petits coques par 2 ou en courtes chaînes
V24-180	BHIYE-Ae	Petite, marron	Culot moyen net + trouble clair	-	-	Petits coques en longues chaînes
V24-181	BHIYE-Ae	Petite, marron	Culot moyen net + trouble clair	-	-	Petits coques en longues chaînes
T0-190	BHIYE-Ae	Contour irrégulier, plate	Gros culot+trouble intense	-	-	Petits coques assez réfringents isolés ou par 2, des chaînes de 4
T0-191	BHIYE-Ae	Contour irrégulier, plate	Gros culot+trouble intense	-	-	Petits coques assez réfringents isolés ou par 2, des chaînes de 4
T0-192	BHIYE-An	Contour irrégulier, plate	Gros culot+trouble intense	-	-	Petits coques assez réfringents isolés ou par 2, des chaînes de 4

2.3 Discussion

L'évaluation du microbiote du blé fermenté des échantillons E et V montre que les BL sont la flore dominante durant toute la période de fermentation, malgré leur charge très négligeable dans le blé non-fermenté. Le développement des BL s'est fait au détriment d'une flore fongique déjà présente avant la fermentation, qui a progressivement disparu au cours du processus fermentaire.

Les résultats montrent que le blé utilisé pour la fermentation est de bonne qualité mycologique. Quantitativement et qualitativement, la flore identifiée témoigne d'un bon séchage et des bonnes conditions de stockage. Les mêmes résultats sont observés dans les échantillons de blé fermenté. Les quelques rares espèces isolées (*Moniliella acetoabutens* et *Penicillium fellutanum*) sont largement répandus dans la nature (sol, céréales et de graines) et leur toxicité n'a jamais été signalée dans la littérature (Botton, 1990).

La croissance des champignons filamenteux, aérobies, est probablement affectée par l'atmosphère confinée et la réduction des taux d'oxygène ; ce qui explique leur distribution hétérogène entre la surface et la profondeur des jerrycans. L'accumulation importante des quantités de CO₂ peut avoir un impact considérable sur leur viabilité. Des études sur l'effet des concentrations élevées de CO₂ sur la flore fongique, en présence d'autres facteurs comme l'acidité et la pression osmotique, ont révélé sa nocivité sur les moisissures et les levures (Jones and Greenfield, 1982; Haas *et al.*, 1989). De plus les formes filamenteuses des levures, détectées, dans la présente étude, est une réponse aux conditions de stress et de limitation des nutriments (Cullen and Sprague, 2012). Ces conditions, extrêmes au développement des champignons, ont favorisé la croissance et la multiplication des BL. Ces BL, pourraient même exercer un antagonisme par la production de substances antifongiques, largement démontrée dans de nombreux travaux de recherche (Mandal *et al.*, 2013; Crowley *et al.*, 2013).

Les BL, évoluent durant tous les stades de la fermentation et dans les deux échantillons E et V. Ces résultats sont en accord avec beaucoup d'études sur le microbiote des céréales fermentées, où elles sont souvent décrites comme étant la communauté bactérienne dominante dans ces types d'écosystèmes alimentaires (Guyot, 2010, 2012). La plupart des aliments fermentés à base de céréales comportent une phase de fermentation menée par les BL et qui peut être ou non associée à une autre étape de fermentation alcoolique par les levures (Jespersen, 2003).

Le nombre de BL, cultivables, est inférieur à celui rapporté par les auteurs sur les aliments et boissons à base de céréales fermentés traditionnellement. Leurs dénombrements dans des produits, comme : *hussuwa* , *ben-saalga* , *togwa* et *koko*, varient entre 7 et 11 log UFC g⁻¹, ce qui dépassent nos résultats (Mugula *et al.*, 2003; Lei and Jakobsen, 2004; Tou *et al.*, 2006; Yousif *et al.*, 2010). Dans les produits cités ci-dessus, les périodes de fermentation décrites par les auteurs varient de 24 h jusqu'à 1 mois, alors que dans notre cas elles sont beaucoup plus importantes (jusqu'à 24 mois). De plus, le stress naturel comme l'acidité générée par les BL pourrait également affecter leur physiologie et les pousse à entrer par conséquent dans le stade VBNC (viable but non cultivable). Par ailleurs, il est largement accepté que les techniques culture-dépendantes ne révèlent pas la vraie population microbienne dans son écosystème naturel. Ceci peut être expliqué, entre autres, par l'incapacité des milieux disponibles à détecter toutes les espèces (Giraffa, 2014).

Dans la présente étude, sur les 69 isolats sélectionnés, les lactocoques dominent l'écosystème en association avec les lactobacilles. Dans les échantillons V il ya une sorte d'alternance de dominance durant toute la période d'affinage, alors que dans les échantillons E, les lactocoques sont prédominants aux 3 premiers mois. Dès le 6^{ème} mois les lactobacilles semblent prendre le dessus. Dans la majorité des études réalisées, sur les aliments fermentés à base de céréales, les lactobacilles sont les plus dominants en association avec différents lactocoques ou coccobacilles des genres *Weissella*, *Pediococcus*, et *Lactococcus*. Cependant, ils existent quelques céréales fermentées dont la flore lactique est dominée par les lactocoques. La dominance est souvent un état transitoire dû à la succession de différentes populations de BL pendant le processus fermentaire (Guyot, 2010).

2.4 Conclusion

L'ensemble des résultats a montré que la fermentation dans les jerrycans selon le procédé reproduit, permet l'assainissement du blé contre le développement d'une flore fongique indésirable grâce à l'installation d'une flore lactique caractérisant le microbiote du blé fermenté. Les BL du blé fermenté méritent une caractérisation plus approfondie par les méthodes moléculaires. Compte tenu des limites des méthodes culture-dépendantes il est nécessaire de les consolider avec les méthodes dites culture-indépendantes pour avoir une vision plus globale et réelle de la flore lactique installée.

CHAPITRE 3: CARACTERISATION MOLECULAIRE DES BL ISOLEES

Les méthodes de biologie moléculaire ont révolutionné les techniques utilisées pour étudier les populations microbiennes et leurs dynamiques dans les aliments fermentés. Elles sont essentielles pour décrire le microbiote des aliments fermentés, afin de caractériser des microorganismes encore non cultivables et de définir la relation entre la diversité microbienne et les propriétés fonctionnelles (Humblot and Guyot, 2008).

Actuellement, deux approches principales sont adoptées pour étudier les écosystèmes fermentaires : l'approche dite culture-dépendante ; concerne les isolats obtenus à partir de la matrice alimentaire par les méthodes culturales classiques puis caractérisés par des analyses moléculaires, et l'approche dite culture-indépendante ; l'ADN ou l'ARN sont extraits directement et analysés à partir de la matrice alimentaire. Les méthodes culture-indépendantes ne sont pas très utiles pour la sélection finale de nouvelles souches, mais elles sont d'une importance fondamentale pour avoir un aperçu complet de l'écologie alimentaire et une définition exacte des principales espèces microbiennes impliquées dans le processus de fermentation (Botta and Cocolin, 2012). Pour déterminer la diversité des microorganismes dans les écosystèmes naturels et pour suivre l'évolution des populations microbiennes dans l'espace et le temps, l'utilisation simultanée des méthodes culture-dépendantes et indépendantes est recommandée (Giraffa and Neviani, 2001; Ercolini, 2004).

Le but de ce chapitre est de caractériser par les méthodes moléculaires la flore de BL dominante dans le blé fermenté :

- identifier les 69 isolats sélectionnés, par les méthodes culture dépendantes, et évaluer leur diversité clonale ;
- suivre la dynamique des BL du blé fermenté, au cours du temps par l'approche culture-indépendante, en utilisant la TTGE.

Nous rappelons, que dans ce chapitre 11 échantillons de blé fermenté sont utilisés (T0, E3, E6, E9, E12, E24, V3, V6, V9, V12 et V24).

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Identification moléculaire des 69 isolats sélectionnés

a) *Extraction de l'ADN génomique*

L'ADN génomique des cultures pures (69 isolats) est extrait sur des colonnes en utilisant le DNeasy Blood tissue kit (Qiagen ; Hilden, Germany), suivant le protocole décrit par le fabricant pour les isolats Gram positif, avec un tampon de lyse préparé au laboratoire. L'ADN est extrait à partir de cultures ensemencées la veille :

- 1 ml de culture bactérienne est centrifugé pendant 15 min à 85000 g ;
- le culot de 1 ml de culture pure est traité par le tampon de lyse (Tris- HCl : 20 mM ; pH : 8,2 ; EDTA : 1% ; Triton : 100x ; lysozyme : 20 mg/ml ; mutanolysine : 10 µl/ml) et incubé durant 1h à 37°C ;
- les protéines associées à l'ADN sont ensuite hydrolysées par 25 µl de protéinase K (20 mg/ml) pendant 30 min à 56°C.
- de l'éthanol absolu (-20°C) est ajouté au lysat et incubé 5 min à température ambiante, puis déposé sur les colonnes (fournies avec le Kit) ;
- les impuretés sont éliminées par des lavages successifs des colonnes par les tampons fournis avec le kit.
- l'ADN génomique pur est ensuite élué par le tampon d'éluion après incubation des colonnes 10 min à 70°C et à sec. Cette méthode améliore grandement les rendements d'extraction (Parayre *et al.*, 2007).

b) *Dosage et quantification de l'ADN extrait*

Les concentrations en ADN sont déterminées par le spectrophotomètre Nanodrop DN-1000 (Labtech, Palaiseau, France) à 260 nm. Pour optimiser les conditions d'amplification de l'ADN, les concentrations devraient être ≥ 25 ng/µl.

c) *Amplification des séquences d'ADNr 16S par la paire d'amorces universelle*

Le gène de l'ARNr 16S est amplifié par les amorces *W001* et *W002* selon (Godon *et al.*, 1997) en utilisant le thermocycleur TM C1000 (Bio Rad , USA) ; avec un programme comportant une étape de dénaturation initiale à 96°C pendant 4 min, suivie par 35 cycles de 40 s à 96°C, 30 s à 50°C et 1 min 30 s à 72°C, et finalement un cycle à 72°C pendant 10 min.

L'amplification est réalisée dans un volume total de 50 μ l. La composition du milieu réactionnel et les séquences des amorces utilisées sont mentionnées dans le tableau 12.

Tableau 12 : Composition du milieu réactionnel de la PCR de l'ADNr 16S par la paire d'amorces universelle.

Réactifs PCR	Fournisseur	Volume (μ l)
H2O pure stérile	Sigma	38,5
Tampon Taq avec MgCl ₂	Q-Biogene	5
DNTP (5 mM)	Q-Biogene	2
Amorce W001 (60 μ M)	Sigma	1
Amorce W002 (60 μ M)	Sigma	1
Taq (2,5U/ μ l)	Q-Biogene	0,5
Extrait d'ADN		2

Séquences des amorces (5'-3')	Taille du produit de PCR attendue
W001	AGAGTTTGATCMTGGCTC 1500 pb
W002	GNTACCTTGTTACGACTT

d) Amplification des gènes de ménage

Pour discriminer les espèces étroitement liées, les gènes de ménage *rpoA* (RNA polymérase alpha-subunit) et *pheS* (phenylalanyl-t-RNA synthetase alpha-subunit), sont séquencés. L'amplification est réalisée comme décrite par Naser *et al.* (2007) avec quelques modifications :

- **Le gène *rpoA*** est amplifié par les amorces 21F et 23R avec un programme comportant une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivie par 20 cycles ; 1 min à 95°C, un gradient de 55 à 45 °C (0,5°C/cycle) pendant 30s et 1 min 15 s à 72°C. 10 autres cycles ; 1 min à 95°C, 30s à 45 °C et 1 min 15 s à 72°C. Finalement un cycle à 72°C pendant 7 min.
- **Le gène *pheS*** est amplifié par les amorces 21F et 23R avec un programme comportant une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivie par 20 cycles ; 1 min à 95°C, un gradient de 65 à 55 °C (0,5°C/cycle) pendant 30s et 1 min 15 s à 72°C. 10 autres cycles ; 1 min à 95°C, 30 s à 55 °C et 1 min 15 s à 72°C. Finalement un cycle à 72°C pendant 7 min.

Tableau 14: Milieu réactionnel de la PCR espèce-spécifique de *Leu. mesenteroides*

Réactifs PCR	Fournisseur	Volume (µl)
H ₂ O pure stérile	Sigma	18,75
Tampon Taq avec MgCl ₂	Q-Biogene	2,5
DNTP (5mM)	Q-Biogene	1
Amorce <i>Lnm 1</i> (60µM)	Sigma	0,25
Amorce <i>Lnm 2</i> (60µM)	Sigma	0,25
Taq polymérase (2.5U/µl)	Q-Biogene	0,25
Extrait d'ADN		2

Amorce	Séquences des amorces (5'-3')	Taille du produit de PCR attendue
<i>Lnm1</i>	TGTCGCATGACACAAAGTTA	290 pb
<i>Lnm2</i>	ATCATTTCTATTCTAGCTG	

Tableau 15: Composition du milieu réactionnel de la PCR multiplexe de *Pediococcus. spp.*

Réactifs PCR	Fournisseur	Volume (µl)
H ₂ O pure stérile	Sigma	12
Tampon Taq avec MgCl ₂	Q-Biogene	2,5
DNTP (5mM)	Q-Biogene	1
Amorce <i>PPE-F</i> (60µM)	Sigma	1
Amorce <i>PPE-R</i> (60µM)	Sigma	1
Amorce <i>PAC-F</i> (60µM)	Sigma	1
Amorce <i>PAC-R</i> (60µM)	Sigma	1
Amorce <i>LBU-F</i> (60µM)	Sigma	1
Amorce <i>LBU-R</i> (60µM)	Sigma	1
Amorce <i>PPA-F</i> (60µM)	Sigma	1
Amorce <i>PPA-R</i> (60µM)	Sigma	1
Taq polymérase (2.5U/µl)	Q-Biogene	0,5
Extrait d'ADN		1

Amorce	Séquences des amorces (5'-3')	Taille du produit de PCR attendue
<i>PPE-F</i>	GGGAACGGTTTTAGTTTTATACG	396 ^(A) pb
<i>PPE-R</i>	CTAAGAGCGGTGATGATAAG	
<i>PAC-F</i>	ATGATGGACAGACTCCCTG	776 ^(B) pb
<i>PAC-R</i>	CGAGCTGCGTAGATATGTC	
<i>LBU-F</i>	CTATCTTTAACCGCATTGCCG	1007 ^(C) pb
<i>LBU-R</i>	GACACGCTTCTCATGATTGTC	
<i>PPA-F</i>	GCATGAATCACTTTTCGCTC	331 ^(D) pb
<i>PPA-R</i>	CAAAGATTGTGACCCAGTTG	

^(A)*P. pentosaceus* ; ^(B)*P. acidilactici* ; ^(C)*L. buchneri* ; ^(D)*P. parvulus*

L'amplification est réalisée dans un volume total de 50 μ l. La composition du milieu réactionnel et les séquences des amorces utilisées sont mentionnées dans le tableau 13. Les produits PCR amplifiés sont analysés et séquencés comme décrit ci-dessus dans la section de séquençage de l'ADNr 16S.

Tableau 13: Composition du milieu réactionnel de la PCR des gènes de ménage *pheS* et *rpoA*.

Réactifs PCR	Fournisseur	Volume (μ l)
H ₂ O pure stérile	Sigma	35
Tampon Taq avec MgCl ₂	Q-Biogene	5
DNTP (5mM)	Q-Biogene	2
Amorce F (60 μ M)	Sigma	1
Amorce R (60 μ M)	Sigma	1
Taq polymérase (2.5U/ μ l)	Q-Biogene	1
Extrait d' ADN		5

Amorces	Séquences des amorces (5'-3')	Taille du produit de PCR attendue
rpoA-F21	ATGATYGARTTTGAAAAACC	801 pb
rpoA-R23	ACHGTRTTRATDCCDGCRCG	
pheS-F21	CAYCCNGCHCGYGAYATGC	411 pb
pheS-R23	GGRTGRACCATVCCNGCHCC	

e) PCR espèce-spécifique

Pour valider l'identification de *Leu. mesenteroides* et des espèces de *Pediococcus*, des PCR avec des amorces spécifiques de l'espèce sont utilisées selon la description de Cibik *et al.* (2000) et de Petri *et al.* (2013). Les souches tests sont fournies par le CIRM BIA (UMR STLO, Rennes, France) (tableaux 14 et 15).

f) Vérification des amplicons

Les fragments d'ADN amplifiés des différentes PCR sont vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % (w/v) dans le tampon TBE 0.5x (Tris-Borate-EDTA 10x, Sigma). 5 μ l de chaque amplicon est mélangé à 2 μ l de solution de dépôt (Fermentas, Orange loading dye). La migration se fait dans le tampon TBE 0,5x, sous une tension de 100 Volt pendant 30 min. L'électrophorèse est suivie grâce marqueurs moléculaires de 100 à 1500 pb (Fermentas, Gene Ruler™ 100pb DNA Ladder). Après la migration, le gel est trempé dans une solution de GelRed (3x dans une solution d' NaCl 0,1 M) (FluoProbes®, Interchim, France) pendant 10 à

15 min. Le gel est rincé dans de l'eau distillée pendant 15 min, puis placé sous les rayons UV pour visualiser les bandes.

g) Purification des amplicons

Avant le séquençage des fragments amplifiés, les différents produits de la PCR sont purifiés en six étapes à l'aide du kit QIAquick PCR Purification (Q-Biogene):

- 45 µl de l'amplicon sont mélangés avec 90 µl de tampon NTI ;
- mettre le mélange dans la colonne et centrifuger a 11000 g pendant 30 s ;
- laver deux fois la membrane de silica par l'ajout de 700 µl de tampon NT3, puis centrifuger a 11000 g pendant 30 s ;
- sécher la membrane de silica par centrifugation a 11000 g pendant 30 s ;
- eluer (deux fois) l'ADN par ajout de 20 µl de tampon NE au centre de la membrane, et chauffer 5 min dans un bain sec à 70°C ;
- centrifuger 1 min a 11000 g.

h) Séquençages partiels de l'ADNr 16S et des gènes de ménage *pheS* et *rpoA*

Les produits de la PCR, amplifiés et purifiés, sont séquencés par la méthode de Sanger. Pour chaque produit PCR, les deux brins d'ADN sont séquencés par le service de LGC genomics (Berlin, Allemagne), en utilisant les mêmes amorces que pour la PCR. L'assemblage des séquences et la vérification des chromatogrammes sont réalisés en utilisant le logiciel ContigExpress (Invitrogen). L'interrogation des bases de données NCBI (National Center for Biotechnology Information ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), par blast, est effectuée en utilisant le logiciel Vector NTI (Life Technologies).

3.1.2 Analyse de la biodiversité clonale des bactéries lactiques

A fin de déterminer le degré de biodiversité clonale des isolats de BL, nous avons utilisé deux méthodes : la comparaison de profils d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (*Random Amplified Polymorphic DNA : RAPD*) et la comparaison des profils de restriction du génome par électrophorèse en champs pulsés (*Restriction Endonuclease Analysis Pulsed Field Gel Electrophoresis: REA-PFGE*). 57 isolats des genres, *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Lactobacillus* sont concernés par ces analyses. Les espèces avec un seul isolats (clone unique) ne sont pas impliquées dans cette étude.

a) **RAPD**

Le typage est basé sur l'amplification au hasard de régions d'ADN correspondants à des gènes connus par l'utilisation d'amorces courtes. La RAPD est réalisée avec les amorces décrites par Gosiewski *et al.* (2012).

- **PCR-RAPD**

L'amplification de l'ADN, des 57 isolats, est réalisée dans le thermocycleur C1000TM (Bio-Rad) selon les conditions suivantes : 2 min à 94 °C, 40 cycles ; 1 min à 94°C, 20 s à 42°C et 2 min à 72°C. Une étape finale d'extension à 72°C pendant 10 min. L'amplification est accomplie dans un volume total de 25 µl. La composition du milieu réactionnel et les séquences des amorces utilisées sont mentionnées dans le tableau 16.

Tableau 16: Composition du milieu réactionnel de la PCR-RAPD.

Réactifs PCR	Fournisseur	Volume (µl)
H2O pure stérile	Sigma	19,5
Tampon Taq avec MgCl ₂	Q-Biogene	2,5
DNTP (5mM)	Q-Biogene	1
Amorce (60µM)	Sigma	0,5
Taq (2,5U/µl)	Q-Biogene	0,5
Extrait d'ADN		1

Amorce	Séquences des amorces (5'-3')
1	GGTGCGGGAA
2	GTTTCGCTCC
3	GTAGACCCGT
4	AAGAGCCCGT
5	AACGCGCAAC

- **Electrophorèse sur gel d'agarose**

Les amplicons sont analysés par électrophorèse (100 Volt, 1 h) sur gel d'agarose à 1,5 % (w/v) dans le tampon TBE 0.5x. L'électrophorèse est suivie grâce au dépôt, dans les deux puits des extrémités du gel, d'un marqueur moléculaire de 100 à 3000 pb (Fermentas, Gene Ruler™ 100pb DNA Ladder). Tous les gels sont colorés avec le GelRed (3x dans une solution d'NaCl 0,1 M) (FluoProbes® , Interchim, France) pendant 15-30 min, puis rincés avec de l'eau distillée.

b) REA-PFGE :

Le typage est basé sur la comparaison des profils de restrictions de l'ADN génomique obtenus par des endonucléases qui coupent l'ADN au niveau de séquences spécifiques générant des fragments plus ou moins longs. Comme les séquences reconnues par les enzymes de restriction sont réparties de manière aléatoire et uniforme sur le chromosome bactérien, le nombre et la taille des fragments générés sont caractéristiques de l'isolat étudié. La séparation des fragments par électrophorèse en gel d'agarose permet de comparer les profils de restriction (Cocolin and Ercolini, 2008). La REA-PFGE des 57 isolats est réalisée et adaptée de la méthode décrite par Smith et Cantor (1987) :

- **Repiquage des souches**

A partir de précultures fraîches, des tubes de 10 ml de milieu MRS ou BHIYE sont ensemencés puis incubés à 30°C pendant 8h.

- **Immobilisation des bactéries dans les blocs d'agarose**

La quantité des bactéries à immobiliser dans les blocs d'agarose doit correspondre à environ 6×10^7 bactéries par bloc. Pour ce faire, les cultures doivent avoir une DO $\geq 0,3$ à 650 nm. Toutes les souches n'étant pas à DO $\geq 0,3$, nous avons adapté le volume à prélevé selon la formule:

$$\text{Volume de la culture à prélever (ml)} = 1,5 / \text{DO de la culture}$$

Après le calcul des volumes à prélever, les étapes suivantes sont réalisées :

- les volumes calculés des cultures sont transférés dans des tubes stériles à centrifuger (10 ml) ;
- les cultures sont centrifugées 10 min à 3500 g ;
- les surnageants sont éliminés et les culots sont bien égouttés en retournant les tubes sur du papier absorbant. S'il reste du surnageant dans les tubes, l'agarose est dilué et les blocs seront friables ;
- les culots bactériens sont repris dans 400 μ l de TE à pH 8,0 (Annexe 2) contenant le lysozyme (10 mg/ml), puis remis en suspensions homogènes, et incubés 1 h à 37°C ;
- Pendant la lyse, avec des gants un moule est préparé (fournis avec le système BIO-RAD CHEF DRII) par isolat en fermant la face inférieure du moule par un ruban adhésif ;

- 0,5 g d'agarose est pesé dans un flacon de 100 ml (agarose ULTRAPUR GIBCO-BRL 540.5510 UA) et mélangé avec 50 ml d'EDTA 125 mM (pH 7,0). La solution d'agarose est bouillie au four à micro-ondes puis placée au Bain-Marie à 60°C environ 30 min ;
- les tubes incubés à 37°C sont repris et maintenues, au moins 1 min, au Bain-Marie à 60°C ;
- 700 µl d'agarose à 60°C sont aspirés et refoulés plusieurs fois sans faire de bulles, pour chauffer le cône. Elles sont ensuite transférées rapidement dans le tubes (contenant les bactéries lysées) à 60°C ;
- les tubes sont maintenus dans le bain-Marie à 60°C en attendant de couler le mélange dans les moules ;
- 900 µl du mélange sont transférés rapidement dans les puits du moule, correspondant à chaque isolat, de façon à obtenir 7 à 8 blocs par isolat (environ 100 µl par puits) ;
- les moules sont incubés au réfrigérateur environ 15 min (pas plus, sinon les blocs se rétracteront) ;
- les moules avec les blocs sont récupérés du réfrigérateur, puis les rubans adhésifs sont retiré à l'aide d'une spatule ou d'une pince aux extrémités arrondies.
- tous les blocs préparés, du même isolat, sont glissés dans un flacon contenant la solution TE (pH 8,0) et conservés à 4°C (Annexe 2).

- **Déprotéinisation des blocs d'agarose**

A fin d'éliminer les débris protéiques et d'avoir des blocs transparents, nous avons réalisés les étapes suivantes :

- dans des flacons stériles de 40 ml (par isolat), la solution de lyse est répartie (4 ml de tampon protéinase K (annexe 2), 400 µl de SDS (10 % w/v) et 10 µl de protéinase K 20 (mg /ml) ;
- les blocs d'agarose sont introduits dans les flacons correspondants contenant la solution de lyse ;
- les blocs sont immergés dans la solution de lyse (à cette étape ils sont blancs), puis incubés 2 h à 55°C ;
- la solution de lyse est aspirée en évitant de toucher les blocs. Ces derniers sont translucides à ce stade ;

- les blocs sont rincés 4 x 10 min (ou plus) à température ambiante en remplissant le flacon de TE (pH 8,0) (annexe 2), puis ils sont conservés à 4°C. A ce stade la conservation peut durer plusieurs années.

- **Digestion de l'ADN chromosomique dans les blocs d'agarose par une enzyme de restriction**

Les blocs contenant l'ADN chromosomique bactérien sont prêts pour une digestion enzymatique. La macrorestriction de l'ADN génomique est réalisée par les endonucléases *SmaI* (20 U/ml) et *AscI* (10 U/ml) (New England Biolabs, Hitchin, United Kingdom), suivant les recommandations du fabricant. *SmaI* est utilisée pour la digestion de l'ADN des espèces d'*Enterococcus* et de *Pediococcus*, et *AscI* pour les espèces de *Lactobacillus*.

Le moule pour électrophorèse en PFGE comporte 10 puits, on peut comparer 10 profils de restriction : 8 souches + 2 marqueurs TL 113 (ADN d'une souche de *Propionibacterium* digéré par l'enzyme de restriction *XbaI*) (Lortal *et al.*, 1997) :

- 5,4 ml d'eau Sigma sont mélangés avec 600 µl de tampon de restriction (fournis avec les endonucléases) ;
- dans 20 Eppendorf Safe-lock stériles, 300 µl de tampon diluée sont répartis ;
- avec une spatule à bout rond, un bloc de chacun des isolats est transféré dans les 10 Eppendorfs correspondants (contenant les 300 µl de tampon de restriction dilué au 1/10^{ème}) puis dialysés 1 h à 4°C ;
- 10 à 20 unités d'enzymes de restriction (2 µl/tube) sont ajoutées dans les 10 Eppendorfs restants contenant les 300 µl de tampon de restriction dilué au 1/10^{ème} ;
- les tubes sont bien mélangés par retournement ou par le vortex à vitesse réduite ;
- avec une spatule à bouts rond, les blocs dialysés sont transférés dans les nouveau tubes contenant l'enzyme de restriction ;
- pour permettre la diffusion de l'enzyme dans les blocs, les tubes sont placés 1 h à 4°C, puis incubés au bain-Marie à la température d'activité de l'enzyme (37°C pour *AscI*, *XbaI* et 25°C pour *SmaI*).

- **Préparation du gel d'agarose**

- 2 litres de tampon TBE 0,5x sont préparés (annexe 2) ;
- Le moule est monté sur une surface plane et le peigne est placé en haut du gel (les dents ne doivent pas toucher le fond du moule) ;

- 1 g d'agarose (agarose ULTRAPUR GIBCO-BRL 540.5510 UA) est fondu dans 100 ml de tampon TBE 0,5x puis refroidi à 50°C et coulé (2 à 3 ml d'agarose sont conservés au bain-Marie à 50°C pour le scellage des blocs) ;
- le gel est laissé solidifier pendant 30 à 60 min sur la paillasse ;
- 1,6 litre de tampon TBE 0,5x sont versés dans la cuve d'électrophorèse. La pompe est ensuite démarrée, avec le refroidisseur programmé à 14°C.

- **Mise en place des blocs à sec dans le gel et démarrage de l'électrophorèse en champs pulsés**

L'électrophorèse en champs pulsés des fragments de restriction de l'ADN chromosomique est réalisée avec le système BIO-RAD CHEF DR II :

- après avoir retiré le peigne, à l'aide d'une spatule à bout rond, le bloc digéré de l'ADN de chaque isolat est prélevé et coupé 1 à 2 mm à l'une des extrémités.
- à l'aide d'une 2^{ème} spatule, le bloc est glissé dans le puits correspondant (chargement du gel de gauche à droite). Tous les blocs sont chargés ainsi selon le plan de charge ;
- les blocs sont recouverts avec un peu d'agarose à 50°C de manière à les sceller dans le gel ;
- Après avoir arrêté la pompe, le gel avec les blocs est placé dans la cuve et immergé dans le tampon réfrigéré à 14°C ;
- la pompe est remise en marche et le couvercle est posé en fonçant bien les broches.

- **Paramètres de migration**

Après avoir attendu 10 à 15 min pour que le gel soit à 14°C, les paramètres de migration, sur le module CHEF DR II, sont réglés comme décrits dans le tableau 17.

Tableau 17: Paramètres de migration de la PFGE.

Groupe	Voltage (V/cm)	Temps initial (s)	Temps initial (s)	Temps de migration (s)	Nombre de cycle
Pédiocoques	6	5	50	20	1
Lactobacilles	6	2	20	21	1
Entérocoques	6	5	35	20	2
	6	5	10	4	

c) Analyse des gels

Après migration, tous les gels sont colorés avec le GelRed (3x dans une solution de NaCl 0,1 M) (FluoProbes[®], Interchim, France) pendant 15-30 min, puis rincés avec de l'eau distillée. Les images des gels sont réalisées avec la GBox (Syngene, Cambridge, UK) et analysés par le logiciel Bionumerics version 6.5 (Applied Math, Belgium). Les similarités des profils sont calculées en utilisant le coefficient de Dice et les dendrogrammes sont obtenus par l'algorithme de clustering UPGMA (Unweighted Pair Group Method using an Arithmetic Average).

3.1.3 Identification de la flore lactique du blé fermenté par la méthode culture-indépendante TTGE

La TTGE est un outil de traçabilité moléculaire des populations microbiennes. Après extraction de l'ADN total de la matrice étudiée, une séquence cible est amplifiée puis analysée par électrophorèse dénaturante. La TTGE applique un gradient de température et les fragments obtenus après amplification par PCR sont séparés selon leurs propriétés de fusion. Elle dépend généralement de la teneur en GC et aussi de la composition des acides nucléiques de la séquence (Giraffa and Neviani, 2001; Giraffa and Carminati, 2008). La TTGE a notamment été appliquée à l'UMR 1253-STLO (INRA de Rennes, France) depuis de nombreuses années, cette méthode est choisie et adaptée pour étudier la dynamique des BL dans les 11 échantillons de blé fermenté.

a) Extraction de l'ADN

10 g sont mélangés avec 90 ml de solution de NaCl (0,9%) et incubés 15 min à 46°C. Après homogénéisation dans le Stomacher lab-blender pendant 5 min à vitesse maximale, les culots bactériens sont récupérés par centrifugation différentielle ; 5 min à 2000 g, puis 15 min à 8000 g. L'extraction de l'ADN est réalisée suivant le protocole décrit dans la section précédente.

b) PCR- TTGE

La région V3 du gène de l'ARNr-16S est amplifiée en utilisant les amorces V3P3-GC-Clamp et V3P2 (Licitra *et al.*, 2007). L'amplification de l'ADN est réalisée dans le thermocycleur C1000TM (Bio-Rad) selon les conditions suivantes : 2 min à 94 °C, 35 cycles ;

de 30 s à 95°C, 30 s à 63°C et 1 min à 72°C. Un cycle final d'extension à 72°C pendant 5 min. L'amplification de l'ADN des échantillons (T0, E3, E6, E9, E12, E24, V3, V6, V9, V12 et V24), des marqueurs et de toutes les espèces identifiées dans la section précédente par les méthodes culture-dépendantes, est réalisée dans un volume total de 50 µl. La composition du milieu réactionnel et les séquences des amorces utilisées sont mentionnées dans le tableau 18.

Tableau 18: Composition du milieu réactionnel de la PCR-TTGE.

Réactifs PCR	Fournisseur	Volume (µl)
H2O pure stérile	Sigma	40,5
Tampon Taq avec MgCl ₂	Q-Biogene	5
DNTP (5mM)	Q-Biogene	2
Amorce PPE-F (60µM)	Sigma	0,5
Amorce PPE-R(60µM)	Sigma	0,5
Taq (2,5U/µl)	Q-Biogene	0,5
Extrait d'ADN		1

Amorce	Séquences des amorces (5'-3')	Taille du produit de PCR attendue
V3P2	ATTACCGCGGCTGCTGG	233 pb
V3P3-GCClamp	GCCCGCCGCGCGGCGGGC GGGGCGGGGGCACGGGGGGC CTCGGGAGGCAGCAG	

c) Préparation des gels

Les gels de polyacrylamide 16 cm x 16 cm x 1 mm sont réalisés en incluant les gels de concentration (stacking gel) et de séparation (Annexe 3) ;

- les gels de séparation sont préparés à partir de la solution d'acrylamide (acrylamide-bisacrylamide 37,5 :1) avec une concentration finale de 10% (w/v) en acrylamide et de 7M en urée.
- les stacking gels 10% (w/v) sont préparés avec la solution d'acrylamide (acrylamide-bisacrylamide 37,5 :1).
- les tampons de migration et de préparation des gels sont réalisés avec le tampon TAE 1,25x dilué à partir du TAE 50x (Tris base : 2M ; acide acétique glacial : 1M ; EDTA 50 mM ; pH : 8,0) (Annexe 3).

- la polymérisation des gels d'acrylamide est initiée avec le persulfate d'ammonium et le TEMED (tetramethylethylenediamine) et les gels de séparation et de concentration sont ensuite coulés respectivement entre les plaques de verre (Annexe 3).

d) Conditions de migration

Les produits obtenus de la PCR de la région V3 du gène 16S rRNA, ont fait l'objet de l'analyse TTGE en utilisant le DCode universal mutation detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) (annexe 3):

- 25 µl du produit de la PCR-TTGE sont mélangés avec 10 µl de tampon de charge (bromophénol bleu : 0,05 % ; xylène cyanol : 0,05 % ; glycérol : 70 %), puis introduits dans les puits correspondants ;
- la migration est réalisée à 41 V pendant 16 h avec un gradient de température de 63°C à 70°C (0,4°C h⁻¹), adaptée pour les bactéries à bas GC%.
- après migration les gels sont rincés avec de l'eau distillée pendant 15 min et colorés avec le GelRed (3x dans une solution de NaCl : 0.1M) (FluoProbes[®], Interchim, France) pendant 15-30 min puis décolorés dans de l'eau distillée.

e) Analyse des gels

Les images des gels sont réalisées avec la GBox (Syngene, Cambridge, UK) et analysées par le logiciel Bionumerics version 6.5 (Applied Math, Belgium). Les bandes sont analysées en utilisant la base de données précédemment développée par (Parayre *et al.*, 2007) pour l'identification des espèces. Cette base a été enrichie par les profils de migration des espèces isolées dans ce chapitre.

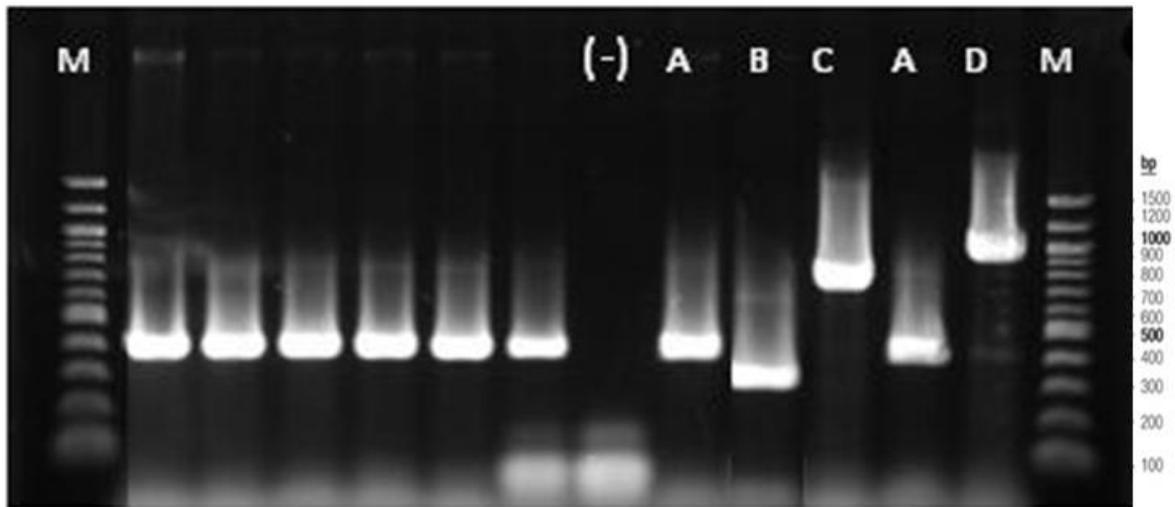


Figure 27: Exemple de gel de la PCR multiplexe avec les amorces SCAR espèces-spécifiques.

^(M) marqueur ; ⁽⁻⁾ témoin négatif ; ^(A) *P. pentosaceus* (CIRM 749) ; ^(B) *P. parvulus* (CIRM 750) ^(C) *P. acidilactici* (CIRM 747) ; ^(D) *L. buchneri* (CIRM 1795). Les puits restants représentent les isolats testés.

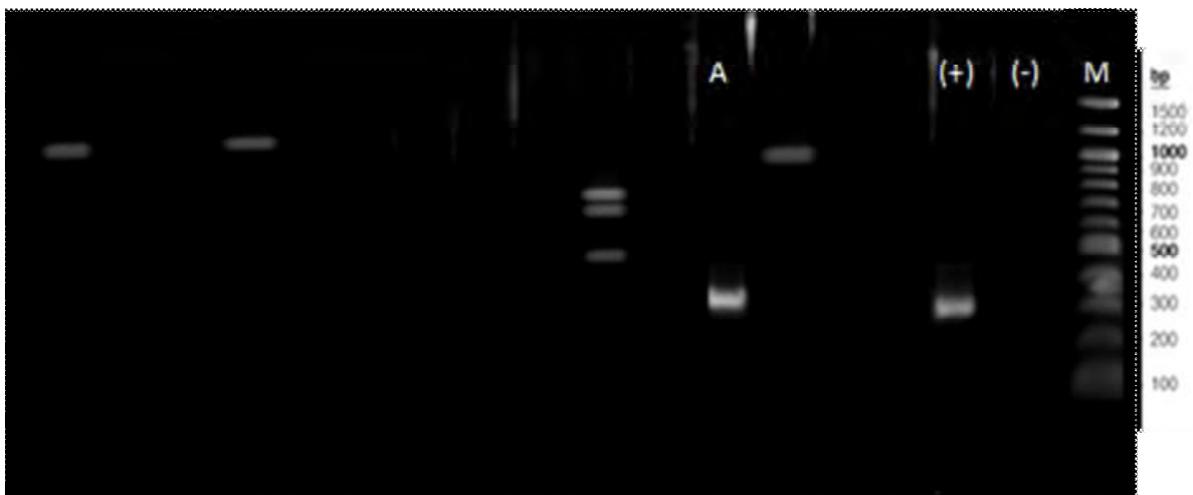


Figure 28: Gel de la PCR espèce- spécifique de *Leu. mesenteroides*.

^(M) marqueur ; ⁽⁺⁾ témoin positif ; ⁽⁻⁾ témoin négatif ; ^(A) E 3-70. Les puits restants représentent d'autres isolats testés.

3.2 Résultats

3.2.1 Identification moléculaire des bactéries lactiques

Les 69 isolats sont identifiés par couplage de différentes méthodes moléculaires (séquençage des gènes de l'ARNr 16S / *pheS* / *rpoA* et les PCR espèces-spécifiques). Les produits de la PCR de l'ADNr 16S, de 1500 paires de base, obtenus par les amorces universelles W001 et W002, sont séquencés et comparés avec ceux d'autres organismes de la base de données GenBank. Toutes les identifications obtenues avec des pourcentages de similitudes \geq à 99%, avec une seule espèce de la base GenBank, sont retenues. Les isolats qui ne pouvaient pas être identifiés au niveau de l'espèce, uniquement sur la base des séquences du gène de l'ARNr 16S (niveaux de similitude élevés mais avec plus d'une seule espèce, ou $<$ à 99%), sont confirmées par le séquençage des gènes de ménages *pheS* et *rpoA* (pour les entérocoques) ou par la PCR multiplexe espèce-spécifique (pour les pediococques) (figure 27). La souche E3-70 est identifiée que par la PCR espèce-spécifique (figure 28).

Les résultats de l'identification des 69 isolats sont présentés dans le tableau 19. Ils appartiennent à 6 genres ; *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Enterococcus* et *Streptococcus*. Ces genres sont représentés par 16 espèces isolées des deux types d'échantillons E et V. 9 espèces dans les échantillons E ; *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. namurensis*, *Leu. mesenteroides*, *L. rapi*, *E. faecalis*, *Enterococcus faecium*, *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, et 10 dans les échantillons V ; *L. coryniformis*, *S. mitis*, *E. hirae*, *W. paramesenteroides*, *Leu. fallax*, *L. curvatus* et *L. pentosus*, *Enterococcus faecium*, *P. pentosaceus*, et *P. acidilactici* (figures 29 et 30). Les trois espèces ; *Enterococcus faecium*, *P. pentosaceus*, et *P. acidilactici* sont présentes dans les deux types d'échantillons E et V.

Les séquences de l'ADNr 16S sont déposées à la base de données GenBank et ont eu les numéros d'accession suivants: KP189205 à KP189234, KP221609 à KP221642, KP062948, KP062949, KP233799 et KP233800. Les séquences des gènes de ménages *pheS* et *rpoA*, des entérocoques, pas encore déposées, sont listées en annexes 4 et 5.

Tableau 19 : Identification des 69 BL isolées des échantillons E et V.

Nombre d'isolats	Déte�t� au stade (mois)						Identification	Similitude des séquences (%)
	0	3	6	9	12	24		
Blé non-fermenté								
3	x						<i>E. faecium</i>	99 ^a /99 ^b
Echantillons (E)								
9			x	x	x		<i>L. brevis</i>	99 ^a
4		x				x	<i>P. pentosaceus</i>	99 ^c
3		x					<i>E. faecium</i>	99 ^a /99 ^b
1		x					<i>E. faecalis</i>	100 ^a /99 ^b
1					x		<i>L. buchneri</i>	99 ^a
1						x	<i>L. namurensis</i>	99 ^a
1		x					<i>Leu. mesenteroides</i>	100 ^d
1		x					<i>P. acidilactici</i>	99 ^c
1		x					<i>L. rapi</i>	99 ^a
Echantillons (V)								
18		x	x	x	x		<i>E. faecium</i>	99 ^a /99 ^b
14			x	x	x		<i>P. pentosaceus</i>	99 ^c
4				x			<i>L. coryniformis</i>	100 ^a
2						x	<i>S. mitis</i>	99 ^a
1					x		<i>P. acidilactici</i>	99 ^c
1		x					<i>E. hirae</i>	99 ^a /99 ^b
1		x					<i>W. paramesenteroides</i>	99 ^a
1		x					<i>Leu. fallax</i>	99 ^a
1		x					<i>L. curvatus</i>	99 ^a
1				x			<i>L. pentosus</i>	99 ^a

^a Pourcentage de similarité basée sur les séquençage du gène de l'ARNr 16S.^b Pourcentage de similarité basée sur les séquençage des gènes *rpoA* et *pheS*.^c Pourcentage de similarité basée sur les séquençage du gène l'ARNr 16S et confirmé par PCR espèce-spécifique.^d Pourcentage de similarité basée sur la PCR espèce-spécifique.*E*; *Enterococcus*, *L*; *Lactobacillus*, *Leu*; *Leuconostoc*, *P*; *Pediococcus*, *S*; *Streptococcus*, *W* ; *Weissella*.

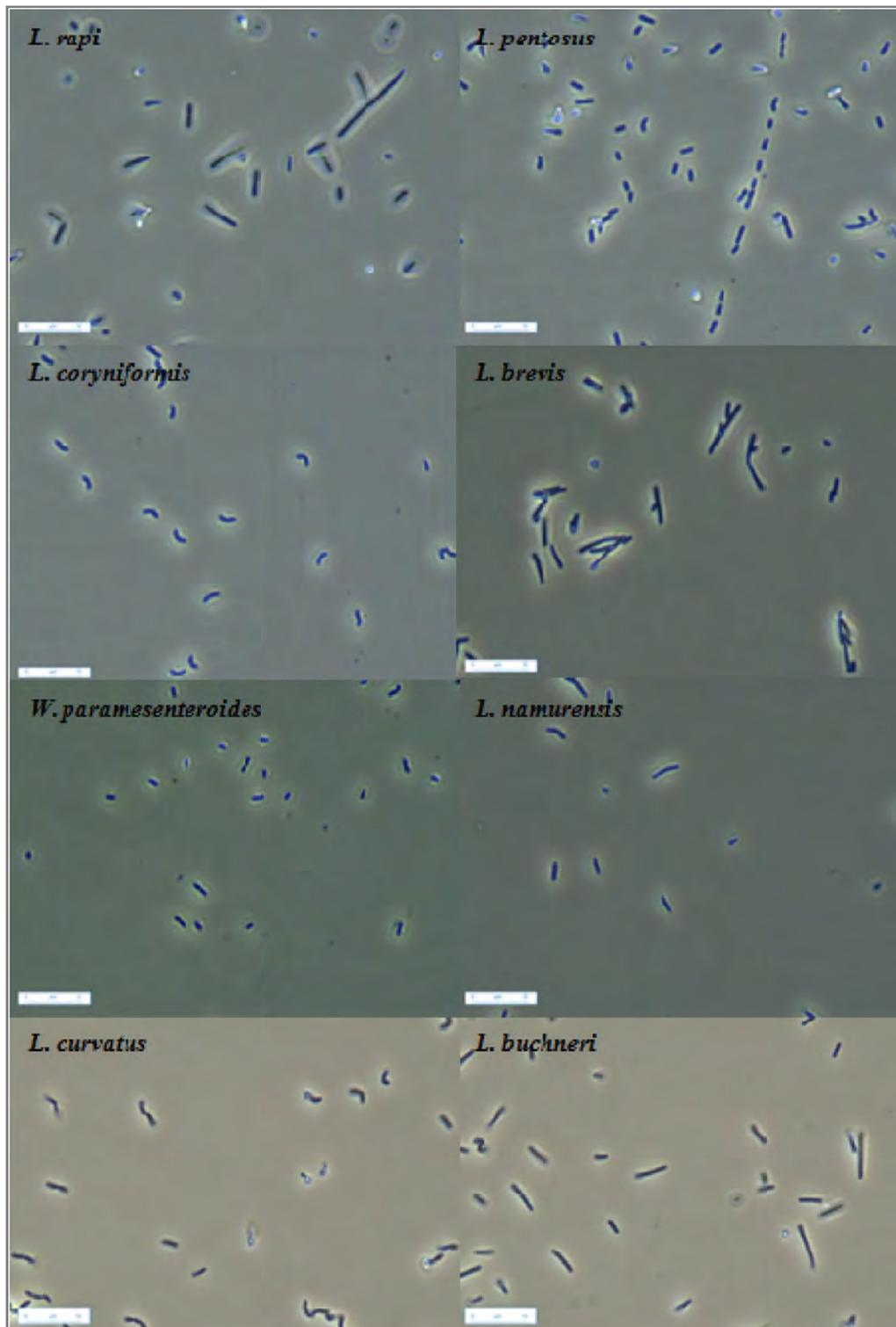


Figure 29: Les lactobacilles isolés à partir des différents stades de fermentation, obtenus par microscopie à contraste de phase (échelle ; 10 μ m).

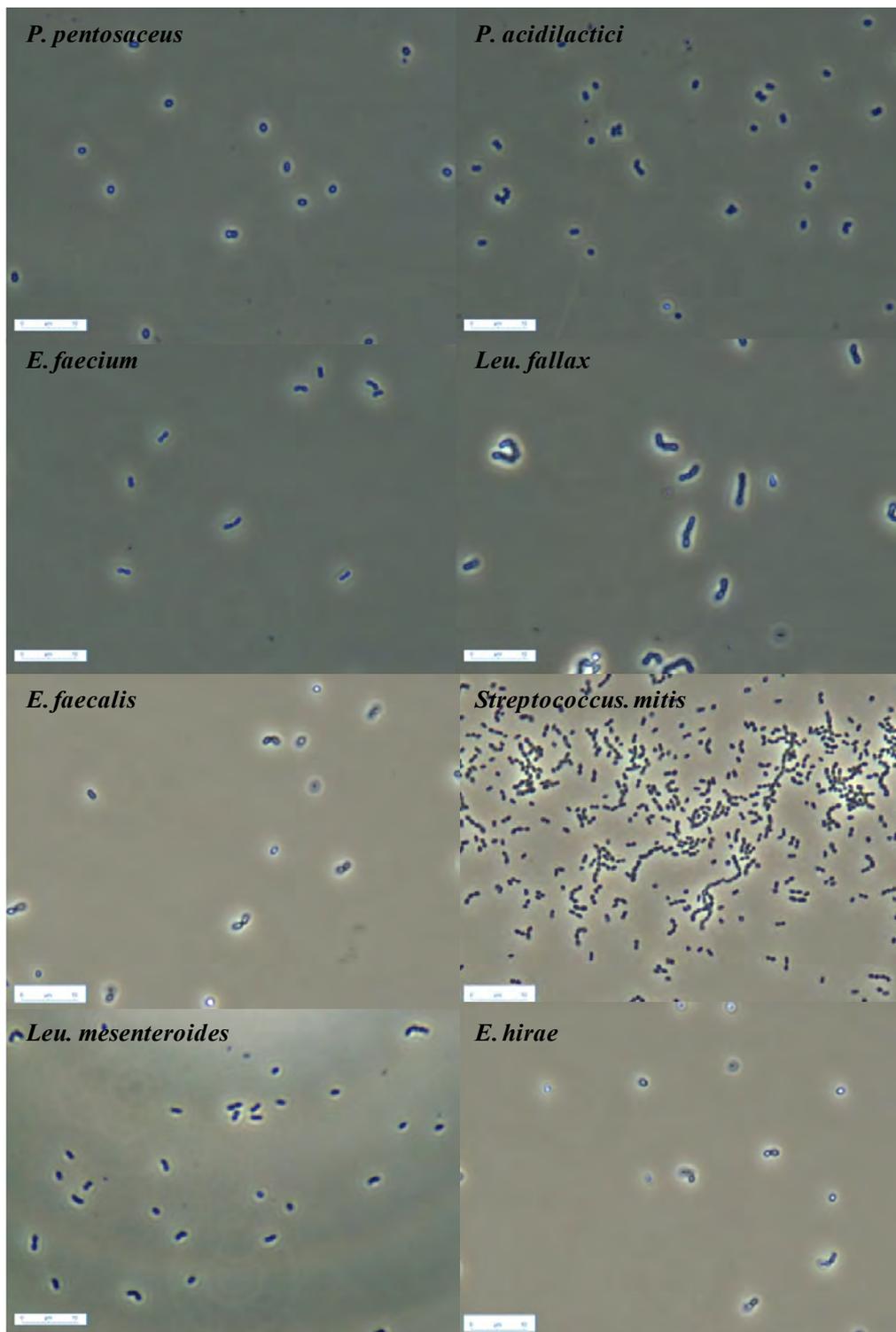


Figure 30: Les lactocoques isolés à partir des différents stades de fermentation, obtenus par microscopie à contraste de phase (échelle ; 10µm).

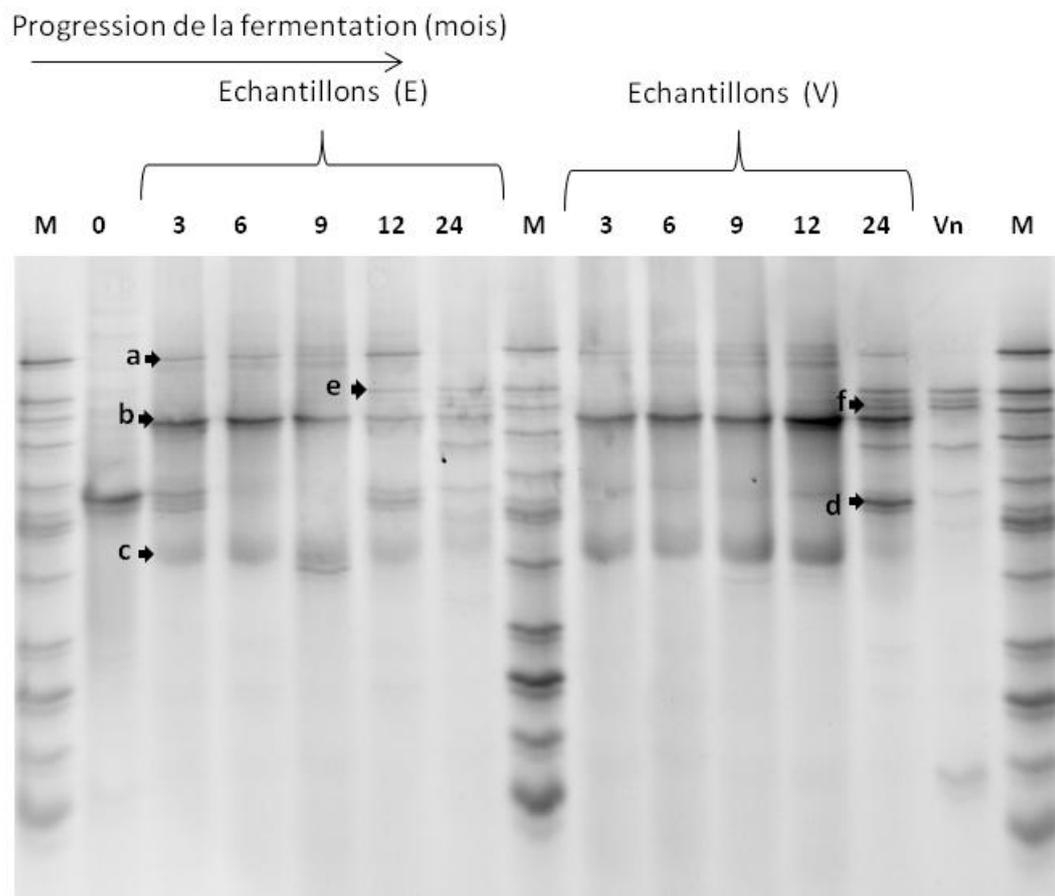


Figure 31: TTGE des fragments de la région V3 du gène de l'ARNr 16S des échantillons de blé fermenté V et E durant 24 mois.

Lignes : M, marqueurs de l'ADN génomique (*L. plantarum*, *E. faecium*, *L. helveticus*, *Lc.lactis*, *S. thermophilus*, *Corynebacterium moorparkense*, *L. paracasei*, *Arthrobacterium nicotianae* et *Brevibacterium casei*); 0, blé non-fermenté; Vn, vinaigre 5°. Les bandes de la PCR-TTGE obtenues à partir des échantillons sont : a, *L. plantarum*/*L. pentosus*; b, *P. pentosaceus*/*L. fermentum*/*Leu. fallax* ; c, *P. pentosaceus*; d, *L. buchneri*/*L. rapi*; e, *E. faecium*/*L. brevis*; f, *L. coryniformis*/*L. helveticus*/*L. acidophilus*.

3.2.2 La TTGE

La TTGE a révélé des profils très similaires dans les deux types de blé fermenté. Elle est caractérisée par deux phases en fonction de deux périodes de fermentation (figure 31) ; dans la première phase (3-12 mois), les profils TTGE montrent une faible complexité composés principalement de trois bandes (a, b et c). La comparaison avec la base de données a indiqué que la bande (a) peut être attribuée à *L. plantarum* ou *L. pentosus*. La principale espèce dominante, représentée par la bande (b), peut être affectée à trois espèces : *P. pentosaceus*, *L. fermentum*, ou *Leu. fallax*. La bande (c) est présente dans la majorité des échantillons à tous les stades de l'affinage et est attribuée à *P. pentosaceus*.

A partir du 24^{ème} mois, les échantillons V et E sont caractérisés par un profil TTGE plus complexe constitué de 5 à 6 bandes dont les trois principales ; (a), (b) et (c). Les trois nouvelles bandes (d), (e) et (f) sont assignées respectivement à : *L. buchneri* ou *L. rafi* ; à *E. faecium* ou *L. brevis* ; et à *L. coryniformis*, *L. helveticus*, ou *L. acidophilus* (figure 31).

3.2.3 Diversité clonale des bactéries lactiques

Afin d'étudier la diversité clonale des espèces prédominantes des genres *Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*, un total de 57 isolats choisis parmi tous les échantillons E et V sont analysés par RAPD et PFGE. Les gels de la PFGE montrent des profils plus complexes comparés à ceux de la RAPD (figures 32 et 33). L'analyse des dendrogrammes des profils de similarité a révélé que les isolats des BL sont regroupés en fonction de la durée de la fermentation et du type d'échantillons (E ou V), quelque soit la méthode utilisée (figures 34 et 35).

Les amorces 1 et 5 sont les plus discriminantes parmi les cinq testées (figure 34). La 1, a permis de distinguer 4 souches sur les 13 isolats de *Lactobacillus* spp. ; 2 *L. brevis* et 2 *L. coryniformis*. Pour les 2 *P. acidilactici*, les 18 *P. pentosaceus*, et les 24 *E. faecium* analysés elle a discriminé, respectivement, 1, 4 et 12 souches distinctes. Par ailleurs, l'amorce 5 a identifié 5 souches sur les 13 isolats de *Lactobacillus* spp. ; 3 *L. brevis* et 2 *L. coryniformis*. Pour les *E. faecium*, les *P. pentosaceus*, et les *P. acidilactici* étudiés elle a différencié, respectivement, 9, 7 et 2 souches distinctes.

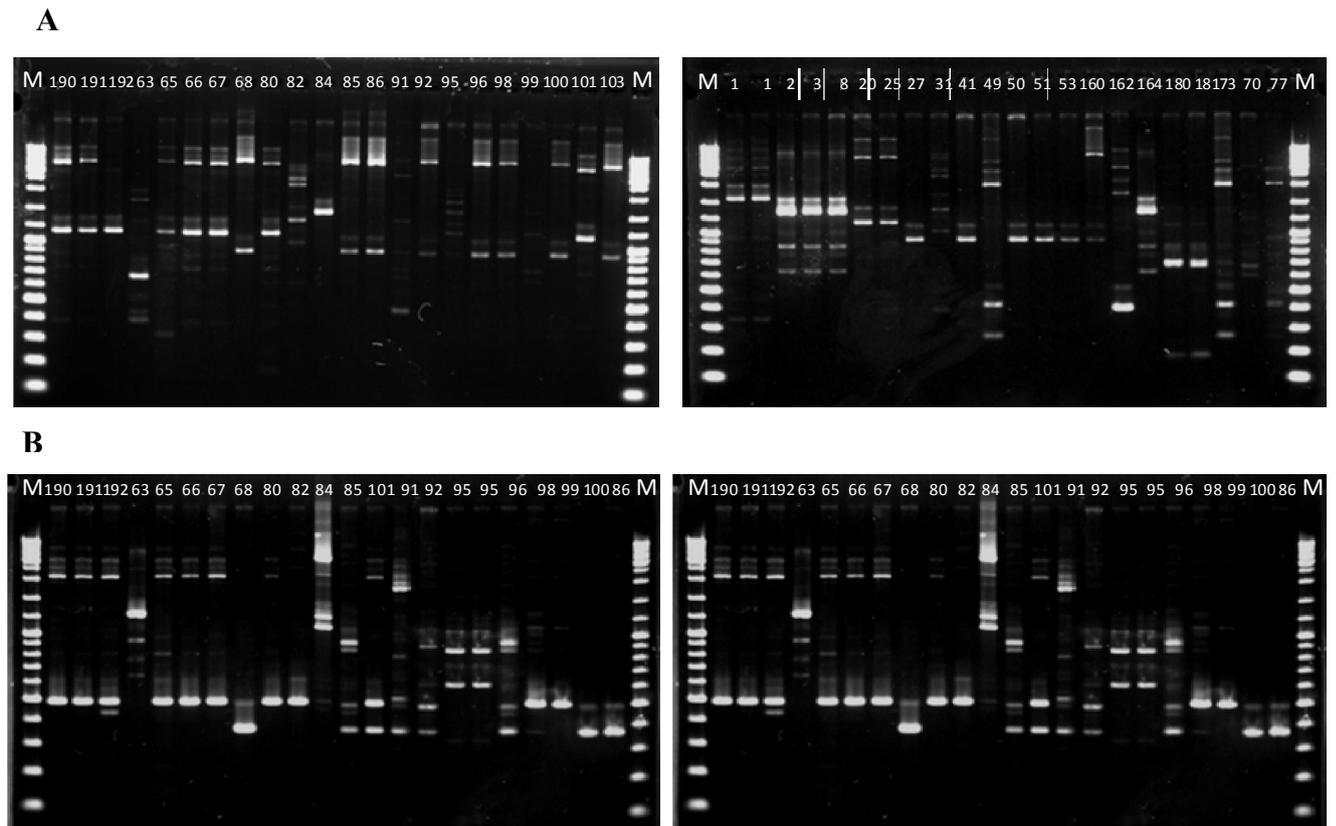


Figure 32: Exemples de profils RAPD : (A) avec le primer 1 et (B) avec le primer 5.

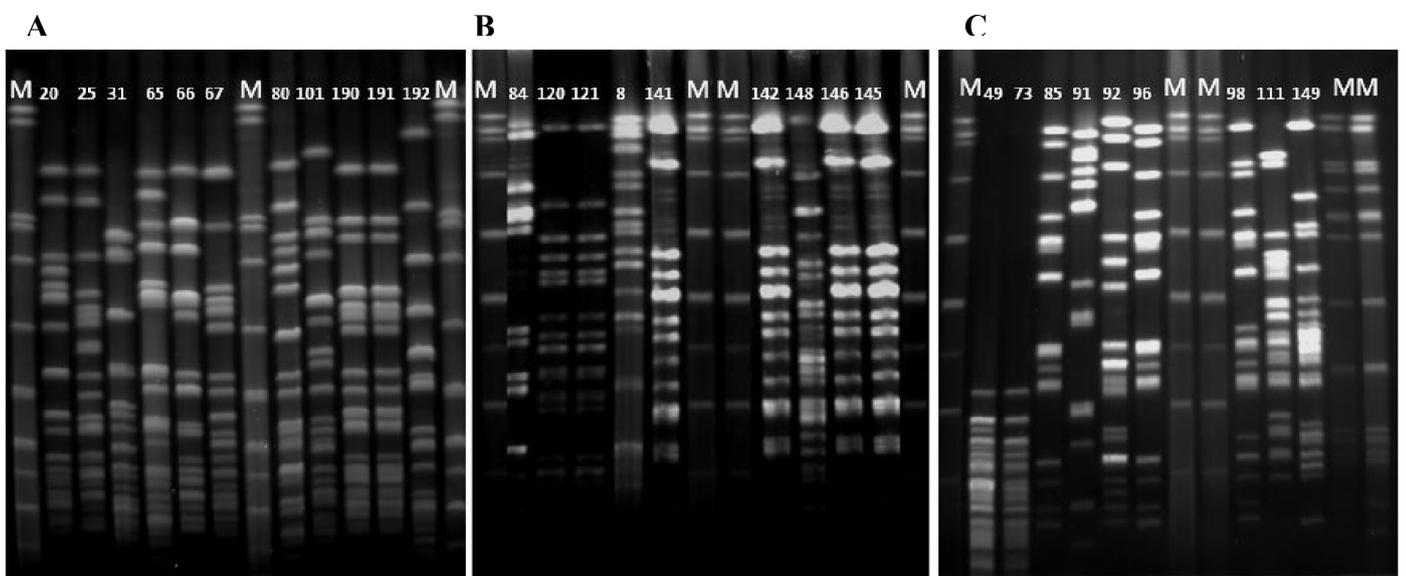


Figure 33: Exemples de profils REA-PFGE : (A) *E. faecium* (B) *Lactobacillus* spp. et (C) *Pediococcus* spp.

M ; marqueurs. Les numéros, représentant les souches testées, sont simplifiés à partir de la numérotation adoptée dans le tableau 11.

Comparés à la RAPD, la PFGE est plus discriminante avec : 21 souches distinctes sur 24 *E. faecium*, 12 sur 18 *P. pentosaceus* et 2 sur 2 *P. acidilactici* (figure 35). Toutefois, nous avons observé un pouvoir plus discriminant de la RAPD concernant les isolats de *L. coryniformis*. La PFGE regroupe les 4 isolats en un seul cluster alors que la RAPD, avec les deux amorces, les divise en 2. D'autre part, les résultats sont, relativement, similaires pour les isolats de *L. brevis* et *P. acidilactici*.

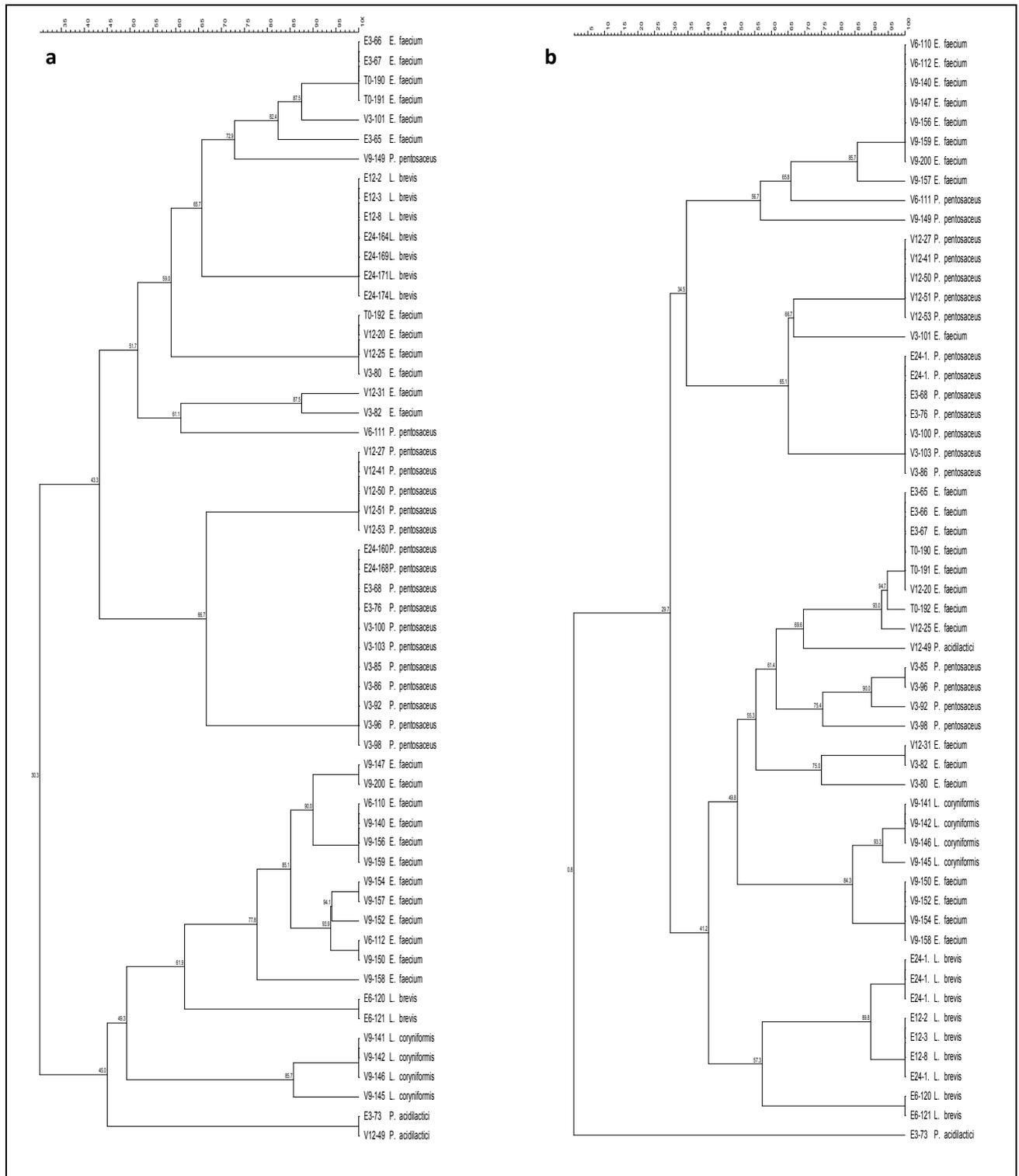


Figure 34: Dendrogrammes de similarité des profils RAPD de : *E. faecium*, *Pediococcus* spp., et *Lactobacillus* spp., isolées à partir de blé fermenté des échantillons E et V en utilisant le primer 1 (a) et le primer 5 (b). Les similarités des profils sont calculées en utilisant le coefficient de Dice et les dendrogrammes sont obtenus par l’algorithme de clustering UPGMA. E ; blé fermenté sans vinaigre, V ; blé fermenté avec vinaigre, T0 ; blé non-fermenté. 3, 6, 9, 12 et 24 ; temps de fermentation en mois.

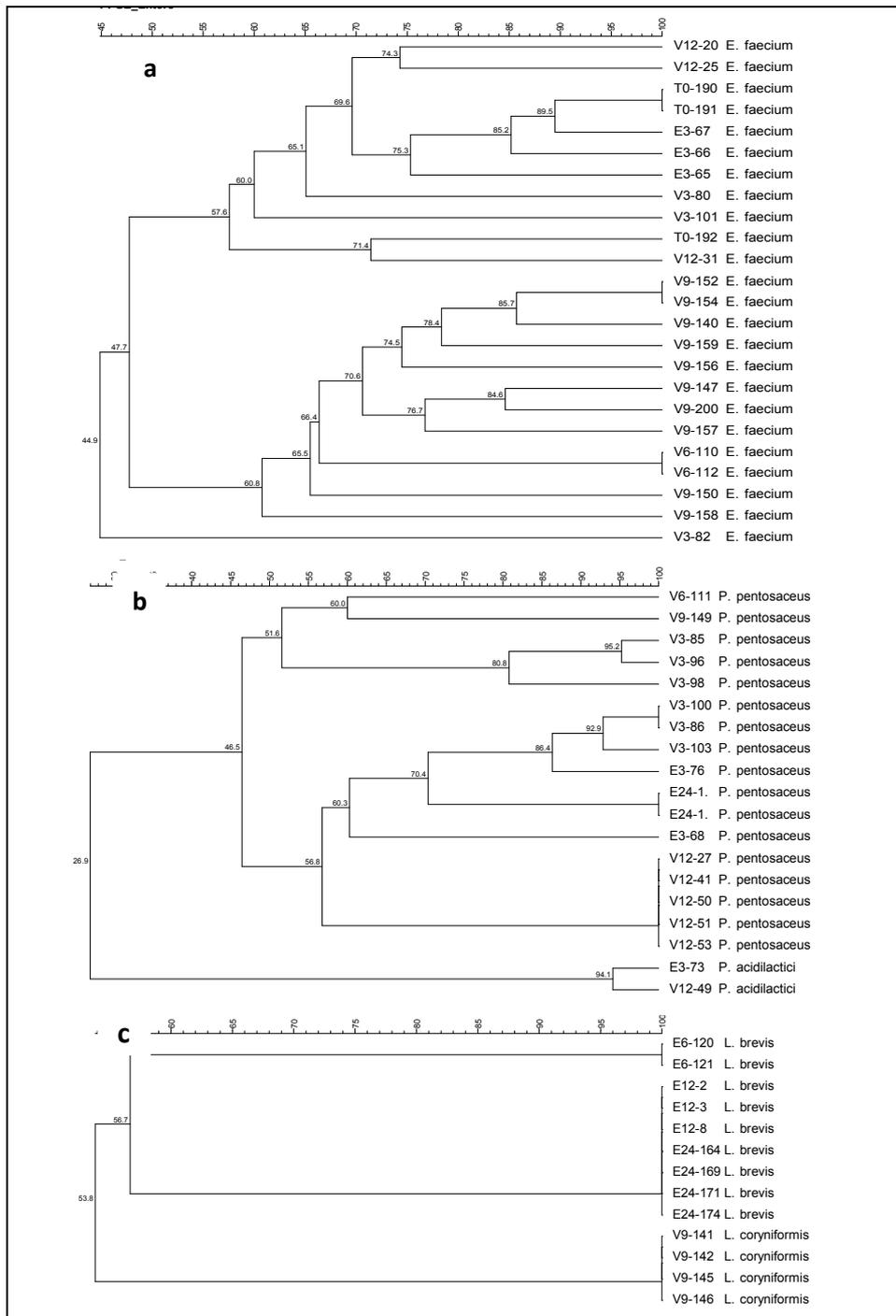


Figure 35: Dendrogrammes de similarité des profils REA-PFGE de : *E. faecium* (a), *Pediococcus* spp., (b) et *Lactobacillus* spp., (c), isolés à partir des échantillons E et V. (a) , (b) sont obtenus avec l'endonucléase *Sma*I, et (c) avec l'endonucléase *Asc*I. Les similarités des profils sont calculées en utilisant le coefficient de Dice et les dendrogrammes sont obtenus par l'algorithme de clustering UPGMA. E ; blé fermenté sans vinaigre, V ; blé fermenté avec vinaigre, T0 ; blé non-fermenté. 3, 6, 9, 12, 24 ; temps de fermentation en mois.

3.3 Discussion

Dans la présente étude 6 genres et 16 espèces sont identifiées dans les échantillons E et V. Au cours de l'évolution de la fermentation, une communauté de BL composée principalement de *P. pentosaceus*, d'*E. faecium* et de *Lactobacillus* spp. s'est installée, en association avec d'autres espèces minoritaires des genres *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Weissella*. La fermentation du blé, sans vinaigre, est dominée par *P. pentosaceus* et des espèces de lactobacilles hétérofermentaires obligatoires, en particulier *L. brevis*. Toutefois, dans le blé fermenté avec vinaigre *P. pentosaceus* et *E. faecium* semblent devenir dominants au cours du temps en présence de quelques lactobacilles. Humblot et Guyot, (2009) ont rapporté une évolution similaire des BL dans les bouillies fermentées de millet, dans lesquelles seuls les représentants des Lactobacillaceae (*Pediococcus* et *Lactobacillus*), des *Leuconostocaceae* et des *Enterococcaceae* sont détectés.

Les principales différences associées à l'addition de vinaigre, sont les espèces de lactobacilles identifiées dans les échantillons, et la présence des isolats d'*E. faecium*, à l'ensemble des stades de la fermentation du blé. De nombreux auteurs ont rapportés la présence des entérocoques au cours des premières phases de la fermentation des levains de sorgho et dans le *pozol*, qui sont ensuite remplacés par d'autres espèces de BL principalement des lactobacilles (Hamad *et al.*, 1997; Ben Omar and Ampe, 2000). Par ailleurs, les entérocoques ont également été signalés comme contaminants dans les farines de céréales et peuvent être présents durant les premières étapes de la fermentation au levain (M'hir *et al.*, 2012).

Les espèces identifiées dans nos échantillons de blé fermenté (E et V), sont en accord avec les populations des BL décrites par les auteurs, évoluant dans les aliments fermentés à base de céréales. *L. brevis*, *E. faecium*, et *P. pentosaceus* sont rapportés comme étant présents en association, ou non, dans divers aliments fermentés à base de céréales tels que *hussuwa* (Yousif *et al.*, 2010), *poto poto* (Abriouel *et al.*, 2006), *ben-saalga* (Tou *et al.*, 2007) et *koko* (Lei and Jakobsen, 2004).

Les échantillons E et V sont caractérisés par une grande diversité des espèces de lactobacilles. *L. rafi*, *L. buchneri*, *L. namurensis*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, et *L. pentosus* ne sont pas fréquemment rapportées dans le blé ou dans les levains de blé. Cependant, certaines d'entre elles sont spécifiques aux microbiote de certains produits à base de céréales

fermentées comme dans le vinaigre vieilli *Shanxi* (*L. buchneri*) et les levains de sorgho (*L. coryniformis* et *L. curvatus*) (Madoroba *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Sekwati-Monang *et al.*, 2012).

Les profils TTGE ont donné une vue de la dynamique des principales espèces de BL évoluant pendant la période de fermentation. Ils ont indiqué que l'espèce dominante, dans tous les échantillons, pourrait être *P. pentosaceus*, *L. fermentum*, ou *Leu. fallax*. Les résultats de l'identification, par les méthodes culture-dépendantes des 69 isolats, suggèrent que cette espèce dominante est probablement *P. pentosaceus*. Il apparaît ainsi que c'est la principale espèce mise en évidence par les deux approches. L'assignement de l'unique bande présente dans le blé non-fermenté est peu probable. Cette bande pourrait appartenir à l'ADN des chloroplastes des céréales, tel qu'a été rapporté par Meroth *et al.* (2004) et par Vrancken *et al.* (2011) dans les levains de blé et de seigle.

Toutefois, certaines divergences entre la TTGE et les méthodes culture-dépendantes sont observées. Des isolats d'*E. faecium* et de *L. brevis* sont détectés, respectivement, dans les échantillons V et E durant toute la période de fermentation, alors que les profils TTGE ont montré leur présence qu'à la fin de la fermentation. De plus, *L. rami*, *L. buchneri*, et *L. coryniformis* sont repérés par les deux méthodes utilisées, tandis que les espèces présentes en petit nombre comme *L. curvatus*, *P. acidilactici* et *Leu. mesenteroides*, entre autres, ne sont pas mises en évidence par la TTGE. Compte tenu de la sensibilité limitée de la PCR-TTGE, il est supposé que l'espèce doit représenter un minimum de 1 % de la communauté totale afin d'être détectée (Muyzer, 1999; Giraffa and Carminati, 2008). Une autre explication possible pour de tels écarts dans la détection des espèces de BL entre les méthodes culture-dépendantes et indépendantes pourraient être l'extraction de l'ADN. Il est très difficile d'extraire l'ADN à partir de toutes les espèces avec la même efficacité dans les populations bactérienne mixtes (Ercolini, 2004).

Nos résultats montrent que la PFGE appliquée aux isolats de *L. brevis*, *Pediococcus* spp., et *E. faecium* est plus discriminante que la RAPD. Toutefois, pour *L. choryniformis* la RAPD avec les deux amorces 1 et 5 semble avoir un plus grand degré de discrimination des clones que la PFGE. Ceci est probablement dû à la sélection de l'enzyme de restriction. L'efficacité du typage par la PFGE peut être amélioré par l'utilisation de plusieurs ou de différentes enzymes de restriction, suivie d'une analyse numérique des patterns combinés (Sánchez *et al.*, 2004). La plupart des études de la biodiversité clonale des BL, conviennent

que le typage par la PFGE en utilisant une endonucléase de restriction appropriée donne le plus grand pouvoir discriminant pour différencier des souches de la même espèce (Vernile *et al.*, 2008; Gosiewski *et al.*, 2012).

Le niveau de la diversité clonale semble diminuer avec le temps de fermentation, pour les lactobacilles et les *Pediococcus*, probablement au profit des souches les plus adaptées au procédé et aux conditions. Oguntoyinbo et Narbad (2012) ont rapporté des résultats similaires pour les céréales fermentées en Afrique de l'Ouest où certaines souches, appartenant principalement aux genres *Lactobacillus* et *Pediococcus*, plus adaptées à l'environnement avec un potentiel d'acidité rapide et d'hydrolyse de l'amidon sont en mesure de dominer. La diversité bactérienne au niveau de la souche est un élément crucial pour la fonctionnalité des BL dans l'écosystème. Des outils efficaces de typage moléculaire sont indispensables pour sélectionner et préparer des starters définis, les caractériser génétiquement, phénotypiquement et technologiquement (Pogačić *et al.*, 2013).

3.4 Conclusion

Cette première étude sur le blé fermenté *lemzeiet* a révélé un niveau élevé de diversité intra- et interspécifique des BL impliquées dans le processus fermentaire, avec au moins 16 espèces identifiées et une grande diversité clonale. *P. pentosaceus* constitue l'espèce dominante dans cette population de BL natives, en association avec des espèces de *Lactobacillus* spp., indépendamment de l'ajout initial de vinaigre.

Toutefois, le nombre d'isolats d'*E. faecium* dans les échantillons, notamment du blé fermenté avec vinaigre, n'est pas négligeable. Nos résultats, à ce stade, ne nous permettent pas de statuer sur leur rôle dans la fermentation du blé en tant que contaminants ou qu'acteurs de la fermentation du blé au même titre que les autres espèces identifiées.

La TTGE est une méthode intéressante, en première approche, pour déterminer d'une manière assez simple et rapide le niveau de diversité des échantillons au cours du temps. Elle a permis l'identification présomptive des BL en utilisant la base de données. Cependant, pour l'identification finale il faudrait recourir à l'extraction des différentes bandes, à l'amplification et aux séquençages de leur contenu en ADN, permettant ainsi de compléter les méthodes culture-dépendantes.

CHAPITRE 4: EFFET DE L'ACTIVITE DES BACTERIES LACTIQUES SUR LES MODIFICATIONS DE LA MATRICE DU BLE FERMENTE

Dans la fermentation des céréales, divers composés sont formés à partir de la transformation des composants majeurs de la matrice (amidon, protéines et lipides) par les enzymes d'origine endogène et microbienne. Ces changements dépendent principalement du type de céréale, des conditions de fermentation et du microbiote présent. En fonction de la structure chimique et des propriétés des métabolites générés par ces activités enzymatiques, le goût, la texture, la flaveur et l'aspect des produits sont affectés (Kamal-Eldin, 2012b; Mehta *et al.*, 2012). L'étude et la caractérisation des activités enzymatiques microbiennes, est fondamentale dans la compréhension et l'évaluation de l'influence du microbiote sur la qualité finale des aliments fermentés (Tamang, 2010e).

Afin de montrer l'effet de l'activité des BL sur les modifications de la matrice, nous avons analysé la composition et les caractéristiques physico-chimiques du blé fermenté. Les profils des acides aminés libres et les composés volatils sont aussi évalués en utilisant, respectivement, la chromatographie d'échange de cations et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Dans ce chapitre, 11 échantillons de blé fermenté sont analysés (T0, E3, E6, E9, E12, E24, V3, V6, V9, V12 et V24). Les activités hydrolytiques des espèces des BL isolées, appartenant à 24 souches différentes, sont également mises en évidence.

4.1 Matériels et méthodes

4.1.1 Analyses physico-chimiques

a) *pH et acidité titrable*

Le pH des échantillons est déterminé par un pH-mètre (Jenway 3505. Angleterre). 20 g de blé fermenté sont introduits dans 80 ml d'eau distillée, puis homogénéisés par le Stomacher lab-blender pendant 2 min à vitesse maximale. Le pH est ensuite mesuré dans le surnageant. L'acidité titrable (AT) est déterminée par neutralisation de toute l'acidité du produit, au moyen de la soude (0.1N), jusqu'au virage complet de la couleur de l'indicateur coloré (AACC méthode internationale 02-31.01).

b) Humidité et cendres

Les teneurs en cendres et en humidité sont déterminées, respectivement, par AACC méthode internationale 08-12.01 et ISO, 712.

c) Teneur en azote

La quantité en azote est déterminée par la méthode Kjeldahl (BUCHI KjeldSampler K-377 combiné à KjeldMaster K-375, Suisse) après minéralisation de la matière organique avec de l'acide sulfurique. La teneur en protéines brutes des échantillons de blé est estimée en multipliant les quantités en azote par le facteur spécifique du blé (5,70) (ISO, 1871).

d) Teneur en matière et acidité grasses

La matière et l'acidité grasses (AG) sont déterminées, respectivement, par les méthodes ISO 7305 et 7302 .

e) Teneur en amidon

La teneur en amidon est estimée par la méthode à l'anthrone (Janeczko *et al.*, 2010). 1 g de blé, finement moulu, est ajouté à 5 ml de solution de HClO₄ (35%). Le mélange réactionnel est incubé à 4°C pendant 24 h. Après centrifugation à 5000 g (5 min), le surnageant est prélevé et l'acidité est neutralisée par addition de 10 ml d'eau distillée et de 1,8 ml de NaOH (0,1 N). 100 µl de cette solution sont mélangés avec 2 ml de la solution d'anthrone (Sigma-Aldrich) (Annexe 6). Le milieu réactionnel est ensuite incubé à 100°C au bain marie pendant 10 min, puis refroidi à 20°C. La lecture de l'absorbance est effectuée à 625 nm par un spectrophotomètre (UVmc2 safas monaco, France). Le glucose (Sigma-Aldrich) est utilisé pour préparer la courbe étalon (Annexe 7).

4.1.2 Dosage des acides aminés**a) Acides aminés libres**

Les acides aminés libres sont quantifiés dans tous les échantillons (11). Ils sont déterminés par chromatographie échangeuse de cations (colonne de 200 mm x 4,6 mm garnie de résine polystyrène sulfonée, réticulée par du divinylbenzène et conditionnée sous forme Lithium), à l'aide d'un analyseur automatique détectant 30 acides aminés (Biochrom Ltd, Cambridge, GB). Le tampon citrate de lithium pH 2,2 (Biochrom), est utilisé comme éluant et

le réactif à la ninhydrine chauffée comme système de révélation (réaction post-colonne). La mesure de la coloration résultante est réalisée à deux longueurs d'onde ; 440 nm (proline et hydroxyproline) et 570 nm les autres acides aminés) (Spackman *et al.*, 1958).

- Préparation de l'échantillon pour essai

2 g de chaque échantillon de blé fermenté, finement broyé, sont mélangés avec 20 ml d'eau déminéralisée hautement pure milli-Q™ (Millipore Corporation). Le mélange est ensuite mis en agitation 1 h à température ambiante puis homogénéisé avec l'Ultra-Turrax (IKA Labortechnik, Staufen, Germany) pendant 2 min. Le mélange est remis encore une fois en agitation une nuit à 4°C. Enfin, une seconde homogénéisation avec l'Ultra-Turrax pendant 1 min.

- Déprotéinisation

1 ml de la suspension préparée, est introduit dans un Eppendorf contenant 50 mg d'acide sulfosalicylique déshydraté (Sigma, Aldrich). Le mélange est homogénéisé et le tube est placé dans la glace pendant 1 h (la température doit être comprise entre 0 et 4 °C). Après centrifugation 15 min à 1000 g, le surnageant est centrifugé une seconde fois dans un Eppendorf, muni de filtre (0,45 µm), pendant 10 min à 500 g. Le filtrat obtenu est dilué dans le tampon citrate de lithium pH 2,2 (Biochrom).

b) Acides aminés totaux

Les acides aminés totaux sont quantifiés, uniquement, dans l'échantillon de blé non-fermenté (T0).

- Acides aminés non-soufrés

La teneur totale en acides aminés est déterminée après hydrolyse des échantillons par de l'acide chlorhydrique (Davies and Thomas, 1973). 20 mg de chaque échantillon sont introduits dans des fioles de 5 ml. 2 ml de HCl (6N) sont ajoutés puis le milieu réactionnel est congelé par l'azote liquide. Les fioles sont scellées, sous vides, puis incubées 24 h à 110°C. Après avoir cassé les extrémités des fioles scellées, le liquide subit une première évaporation à l'aide d'une pompe d'évaporation. L'opération est répétée trois fois après avoir ajouté 0,5 ml d'eau osmosée. Les fioles sont fermées par le parafilm et placées dans le dessiccateur. 5 ml de tampon citrate de lithium pH 2,2 (Biochrom) sont ajoutés et bien homogénéisés avec le

vortex. Après avoir laissé reposer 1h, la suspension est transférée dans les Eppendorf munis de filtre (0,45 μm), puis centrifugée 10 min à 500 g.

- Acides aminés soufrés

En ce qui concerne le dosage des acides aminés soufrés, une étape supplémentaire est nécessaire avant d'ajouter le HCl :

- 20 mg de prise d'essai sont introduits dans les fioles en verre (5 ml) ;
- 2 ml de la solution acide formique /peroxyde d'hydrogène (30%) (Sigma, Aldrich) sont ajoutés à la prise. La solution est préparée à raison de 9/10^{ème} en acide formique et 1/10^{ème} en H₂O₂ (30%) ;
- Les fioles sont incubées 16 h dans un bain de glace ;
- Le milieu réactionnel subit une première évaporation à l'aide d'une pompe d'évaporation (pas à sec), puis l'opération est répétée trois fois après avoir ajouté 0,5 ml d'eau osmosée ;
- 2 ml de HCl (6N) sont ensuite rajoutés.

A partir de ce stade, le protocole suit les mêmes étapes décrites précédemment pour les acides aminés non-soufrés.

c) Analyse chromatographique

Une quantité suffisante du filtrat (volume permettant toutes les injections sans aspiration de bulles) est introduite dans les flacons Vial (Agilent Technologies). Ils sont ensuite placés dans l'alvéole du passeur automatique. Le filtrat est refiltré avant injection s'il présente des particules en suspension.

d) Etalonnage

Une solution étalon à 200 nmole/ml contenant les acides aminés acides, neutres et basiques, est diluée 12,5 fois à partir des solutions mères contenant 2,5 $\mu\text{moles/ml}$ de chaque acide aminé (Sigma, Aldrich). La glutamine est également ajoutée à cette solution à une dose de 100 nmole/ml ainsi que l'urée à une dose finale de 2000 nmole/ml (Sigma, Aldrich). La fréquence d'étalonnage est de un étalon pour 3 échantillons. Nous avons utilisé le logiciel EZChrom Elite pour obtenir directement les résultats en concentration massique (mg/g de semoule analysée).

4.1.3 Analyse des composés volatils par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

Les composés volatils sont extraits par la méthode d'espace de tête "Head space" (HS) avec le système "Purge and Trap", en utilisant l'échantillonneur Turbomatrix HS-40 trapautomatic HS (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). La technique HS est une méthode classique de préconcentration des volatils recherchés dans une matrice complexe non chromatographiable. Ils sont entraînés sur un adsorbant par un flux de gaz inerte. L'appauvrissement permanent de l'espace de tête provoque ainsi un déplacement de l'équilibre qui favorise la désorption des molécules de la matrice. Les molécules piégées sont thermiquement désorbées puis injectées. Elles sont ensuite séparées par CPG et identifiées par SM en utilisant, respectivement, le Clarus 680 GC et le Clarus 600T quadropole (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) suivant le protocole décrit par Pogačić *et al.* (2015).

a) *Extraction*

4 g d'échantillon de blé broyé sont introduits dans des flacons de 20 ml (Perkin Elmer Vial). Ils sont scellés et placés dans le passeur ; connectés ainsi au système de "Purge and Trap". Les échantillons sont chauffés pendant 15 min à 65 °C (équilibre). Les flacons sont ensuite mis sous pression pendant 1 min à 207 kPa avec le gaz porteur (hélium), en introduisant l'aiguille à travers le septum. Le piège Tenax™ à 35 °C est chargé pendant 2,3 min causant la diminution de la pression et permettant l'adsorption et la concentration des analytes de l'HS sur le piège. La charge est répétée deux fois pour chaque flacon. L'eau adsorbée est ensuite éliminée par purge de l'hélium (à sec: 3 min). Le piège est chauffé à 250 °C pendant 0,1 min et rincé sous pression (164 kPa), conduisant à la désorption des analytes. Ils sont ensuite transférés à la CPG à travers une ligne de transfert à 150 °C avec un temps d'injection de 0,6 min. Le piège est maintenu à 250 °C pendant 5 min.

b) *Analyse par CPG/SM*

Après extraction les composés volatils sont séparés et identifiés comme suit :

- La séparation est réalisée dans une colonne capillaire Elite 5MS (60 m × 0,25 mm x 1 µm; Perkin-Elmer), avec l'hélium comme phase mobile ;
- Le temps de purge est de 5 min à 35°C. La température est augmentée à raison de 7°C/min jusqu'à 140 °C puis de 13°C/min jusqu'à 280 °C ;

- Afin de vérifier régulièrement la dérive instrumentale du système CPG/SM et pour générer des courbes standards, une solution de 20 ng / g d'un mélange de 11 composés volatils est injectée (Annexe 8). Les blancs (eau déminéralisée bouillie) sont injectés pour vérifier l'absence de traces ;
- Le spectromètre de masse est opéré dans le mode scan (scan ; 0,3 s et interscan ; 0,03 s) dans une gamme de masse de m/z 29 à 206. L'ionisation est faite par l'impact électronique à 70 eV.

c) *Traitement des données*

Les données de CPG/SM sont traitées par la conversion des données brutes en temps et en masse d'alignement des pics chromatographiques en utilisant le package XCMS Open Source, mis en œuvre avec le langage statistique R (Smith *et al.*, 2006). Les composés sont identifiés par comparaison des spectres de masse et les temps de rétention avec ceux des standards authentiques, ou sur la base de leur indice de rétention et des données de spectrométrie de masse de la NIST 2008 Mass Spectral Library (Instrument services scientifiques, Ringoes, NJ, USA). De tous les signaux générés par XCMS, les composés sont identifiés et quantifiés selon l'abondance d'un ion spécifique (m/z). Les composés non odorants (par exemple les alcanes, les alcènes) et certains contaminants, tels que le trichlorométhane et le toluène ne sont pas retenus dans l'ensemble des données.

4.1.4 Profils enzymatiques des espèces identifiées

Les activités hydrolytiques de 24 souches des espèces isolées, sélectionnées des clones uniques précédemment identifiés par RAPD et PFGE, sont déterminées en utilisant le kit test semi quantitative API-ZYM (bioMérieux, France). L'utilisation de ce kit a été rapporté comme un moyen rapide et simple pour évaluer les activités, de 19 hydrolases, des BL associées aux fermentations des céréales (Sanni *et al.*, 2002; Songré-Ouattara *et al.*, 2008).

A partir de cultures fraîchesensemencées la veille dans les milieux MRS ou BHIYE, 1 ml de culture bactérienne est centrifugé pendant 15 min à 85000 g. Le culot est ensuite resuspendu dans de l'eau physiologique (NaCl 0,9%) pour correspondre à la turbidité convenue en comparaison avec les standards McFarland. Les galeries sont ensuite inoculées et incubées 4 h à 30°C. La lecture est réalisée après ajout des réactifs ZYM A et ZYM B

(fournis dans le Kit). L'évaluation de l'activité est désignée par (+) ou (-) suivant le développement ou non de la coloration indiquée dans la notice d'utilisation.

4.1.5 Analyse statistique

Les données obtenues sont soumises à une analyse de la variance (ANOVA) en utilisant le logiciel statistique R pour déterminer l'influence de l'ajout de vinaigre et du temps de la fermentation sur les différents composés et paramètres analysés. Les moyennes sont comparées en utilisant le test de la plus petite différence significative de Fisher (*LSD*). Une analyse en composantes principales (ACP) est effectuée pour les composés volatils et les acides aminés après une transformation en $\log(x)$ et la mise à l'échelle de Pareto, en utilisant le package FactoMineR du logiciel R.

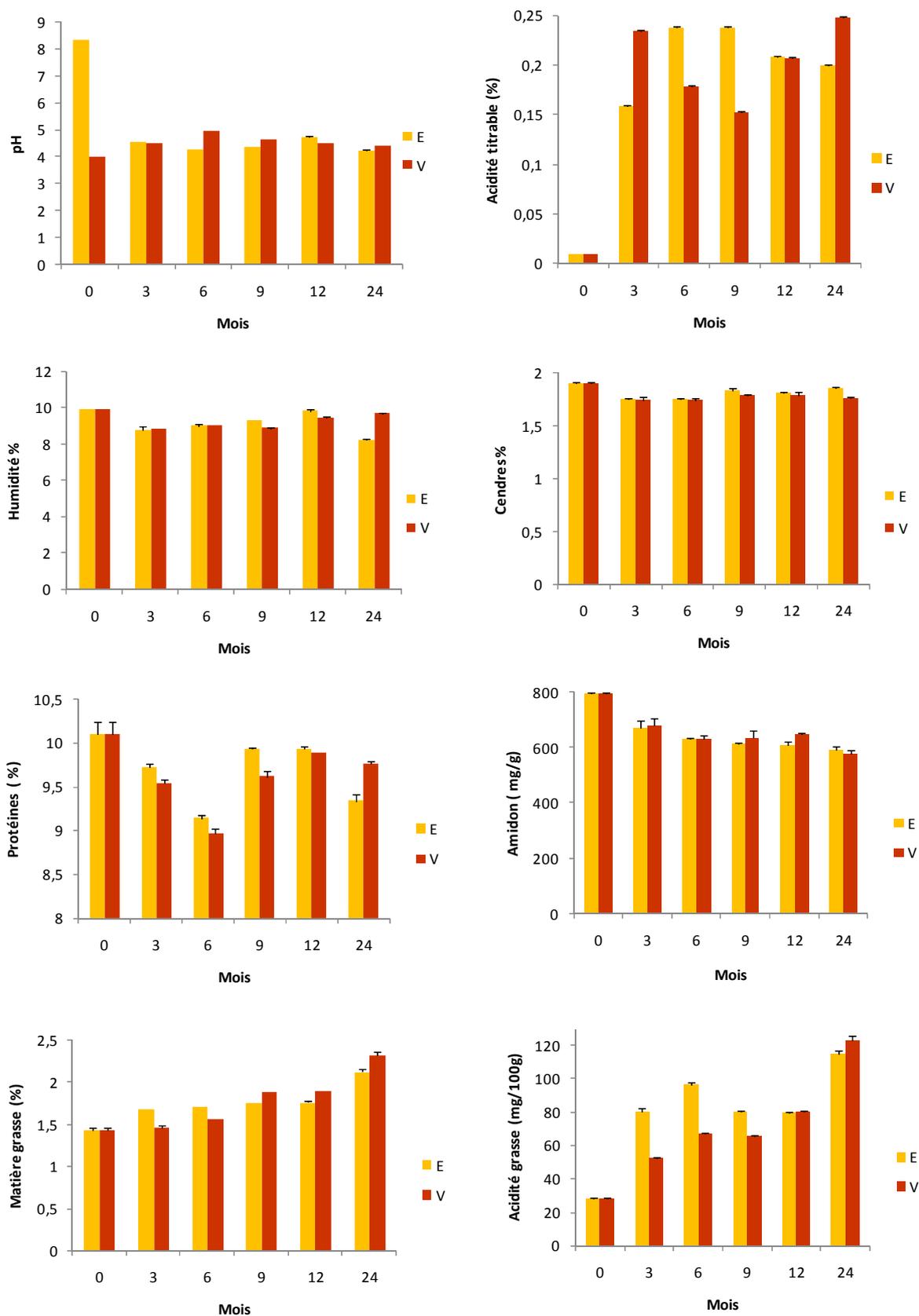


Figure 35 : Variations des paramètres physico-chimiques du blé fermenté sur la base de la matière sèche.

4.2 Résultats

4.2.1 Analyses physico-chimiques

La fermentation du blé a provoqué la diminution du pH et l'augmentation des taux de l'AT et de l'AG, indépendamment de l'ajout de vinaigre. Le pH est de 4,39 à 4,95 dans les échantillons V et de 4,23 à 4,74 dans les échantillons E. Les teneurs de l'AT sont de 0,16 à 0,24 % dans le blé fermenté avec vinaigre, et de 0,15 à 0,25 % (w/w, sur la base de la matière sèche) dans le blé fermenté sans vinaigre. L'AG varie de 51,2 à 122,9 mg/100g et de 79,16 à 114,4 mg/100 g (w/w, sur la base de la matière sèche), respectivement, dans les échantillons V et E (figure 35 et annexe 9).

L'évolution des taux des protéines est marquée par deux phases ; une phase de diminution (du 3^{ème} au 6^{ème} mois) et une autre, d'augmentation, du 9^{ème} mois jusqu'à la fin. Les concentrations dans les échantillons E sont de 10,1 à 9,33 % et dans les échantillons V, elles varient de 10,1 à 9,76 % (w/w, sur la base de la matière sèche) (figure 35 et annexe 9).

La teneur en amidon des différents échantillons a diminué au cours de l'affinage. Elle varie dans les échantillons E de 795,6 à 590,15 mg/g et dans les échantillons V de 795,6 à 578,42 mg/g (w/w, sur la base de la matière sèche). Par ailleurs, Les taux de la matière grasse augmentent progressivement durant l'affinage et représentent 2,32% dans les échantillons V et 2,12% dans les échantillons E après 24 mois de fermentation (figure 35 et annexe 9).

L'analyse de la variance (ANOVA) a montré que les concentrations des différents paramètres suivis sont significativement affectées par le temps d'affinage, le type d'échantillon (E ou V), et par les interactions entre les deux éléments (à l'exception de l'amidon) (tableau 20 et annexe 10).

Tableau 20 : Les valeurs *P* de l'ANOVA montrant l'effet du temps et de l'ajout de vinaigre sur les différents paramètres physico-chimiques.

<i>P</i>	pH	Humidité	Cendres	Protéines	Acidité titrable	Acidité grasse	Matière grasse	Amidon
<i>Temps</i>	***	***	**	***	***	***	***	*
<i>Type d'échantillon</i>	***	**	**	***	***	***	***	ns
<i>Interaction</i>	***	***	**	***	***	***	***	**

*** $P < 0,001$ ** $P < 0,01$ * $P < 0,05$ ^{ns} $P > 0,05$

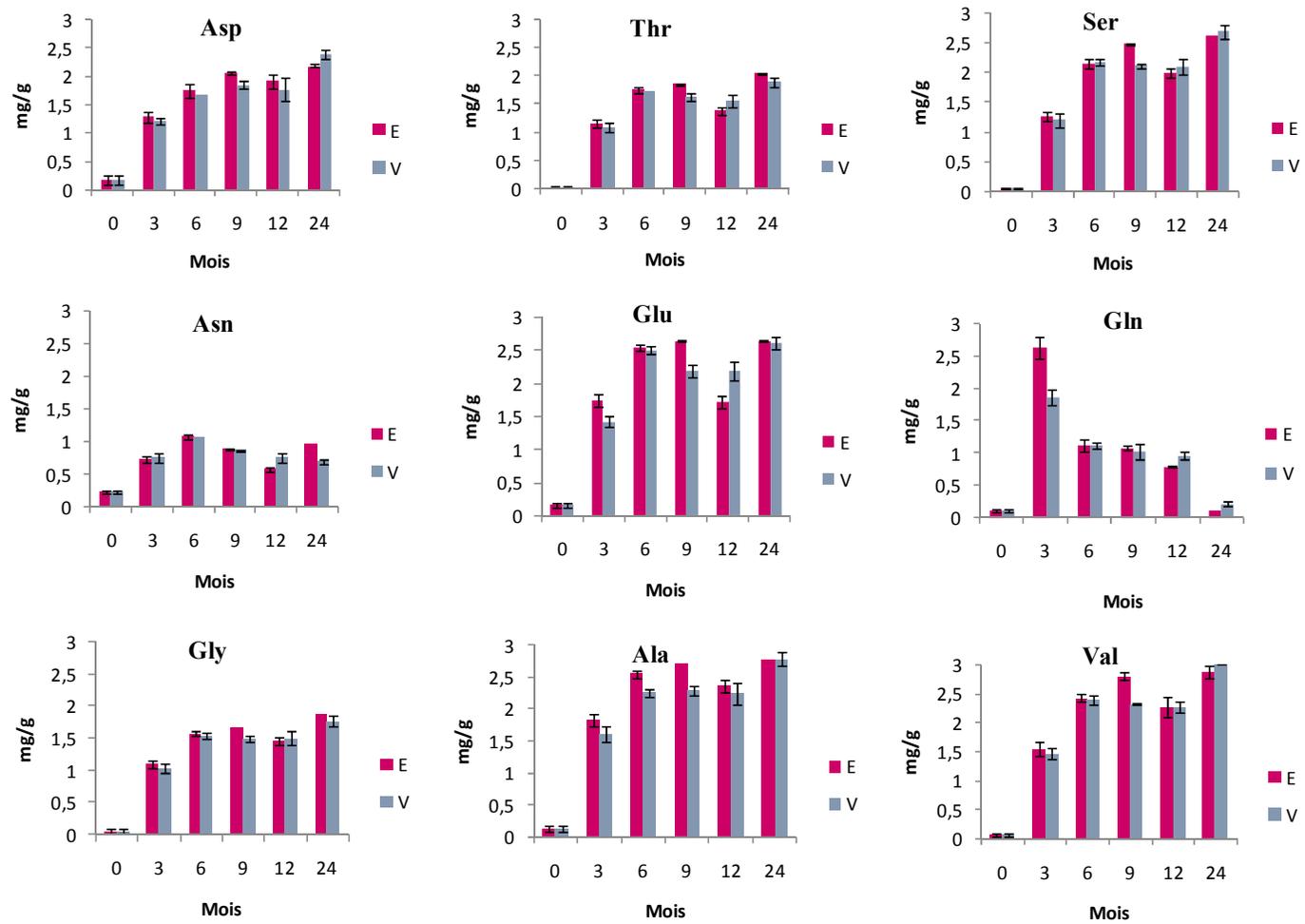


Figure 36 : Taux des acides aminés libres sur la base de la matière sèche.

4.2.2 Acides aminés

Le facteur de solubilisation et les dilutions réalisées sur l'échantillon avant injection sont pris en compte. Les résultats sont donc exprimés en milligramme d'acide aminé par gramme d'échantillon. Les concentrations des acides aminés totaux, dans le blé non-fermenté, ainsi que les pourcentages des acides aminés libres correspondants sont mentionnées dans le tableau 21.

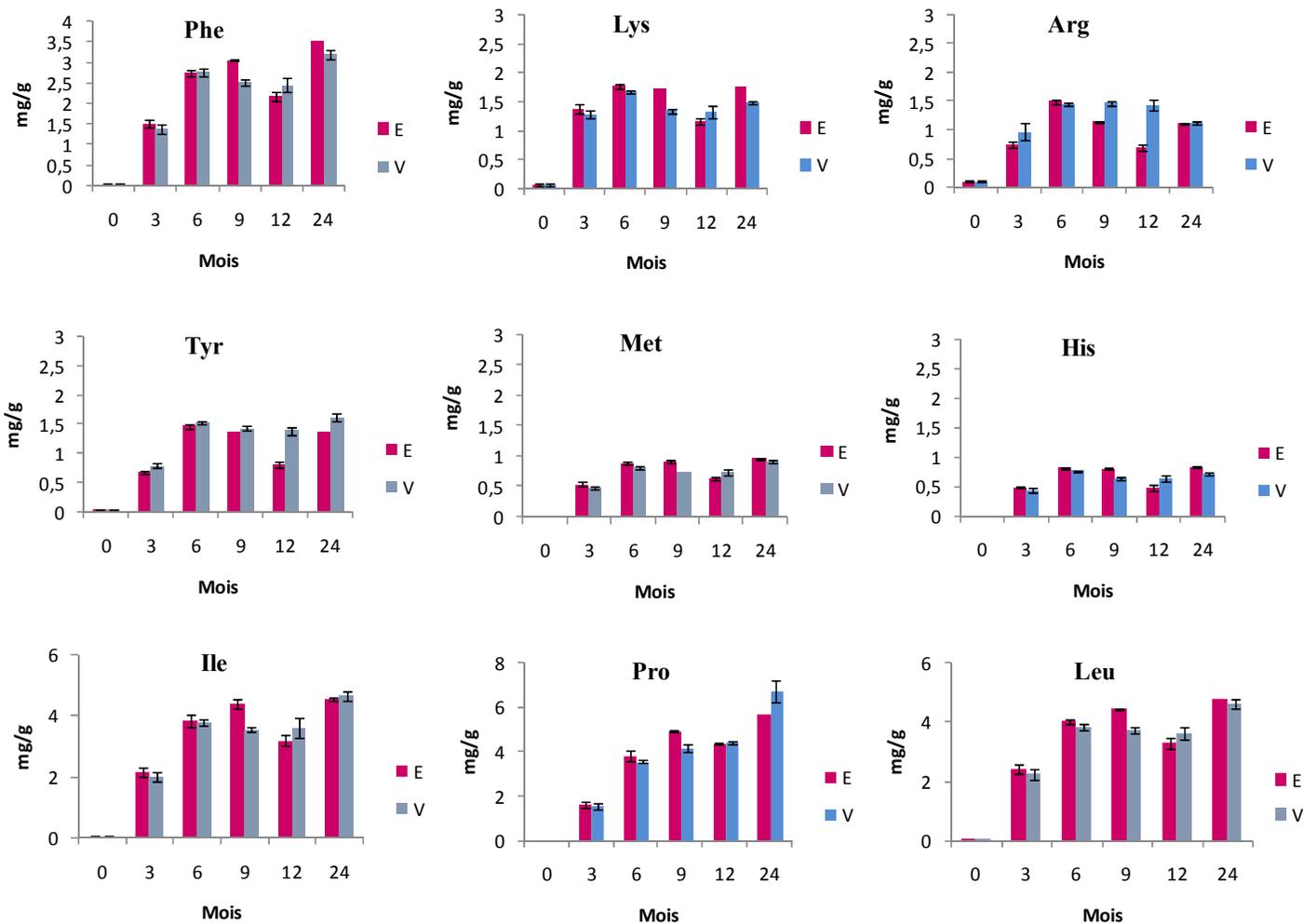
Tableau 21 : Teneurs en acides aminés dans le blé non-fermenté et leurs pourcentages en forme libre dans les échantillons E et V après 24 mois de fermentation.

Acide aminée	Totaux (mg/g)	Libres (%)	
	T0	E24	V24
Asp	5,64 ± 0,19	38,77	42,47
Thr	3,04 ± 0,07	67,23	62,30
Ser	4,38 ± 0,09	59,81	61,34
Glu	26,08 ± 0,30	10,12	10,03
Gly	4,11 ± 0,10	45,90	43,13
Ala	3,95 ± 0,13	70,29	70,46
Val	4,41 ± 0,17	65,28	68,57
Cys	1,47 ± 0,05	5,74	11,59
Met	1,63 ± 0,10	58,89	56,04
Ile	3,52 ± 0,08	128,92	131,81
Leu	6,81 ± 0,14	70,08	67,86
Tyr	2,20 ± 0,20	62,29	73,95
Phe	4,54 ± 0,03	78,01	70,16
Lys	3,19 ± 0,20	55,01	46,80
His	2,38 ± 0,02	34,93	29,74
Arg	4,98 ± 0,02	22,54	22,48
Pro	8,45 ± 0,003	67,07	79,60

E ; blé fermenté sans vinaigre, V ; blé fermenté avec vinaigre, T ; blé non-fermenté, 0-24 ; temps de fermentation en mois.

Les teneurs en acides aminés libres sont représentées graphiquement dans la figure 36. 25 acides aminés sont identifiés, dont 19 acides aminés standards (protéinogènes) et 6 non protéinogènes ; citruline (Cit), acide gamma-aminobutyrique (GABA), β -alanine (β -Ala), ornitine (Orn), homcysteine (Hcy) et éthanolamine (EA). Comparées au blé non-fermenté (T0) les proportions en acides aminés libres dans les échantillons E et V après 24 mois, sont pour la majorité, supérieures à 50% (11 sur 17).

Suite de la figure 36 : Taux des acides aminés libres sur la base de la matière sèche



Suite de la figure 36 : Taux des acides aminés libres sur la base de la matière sèche.

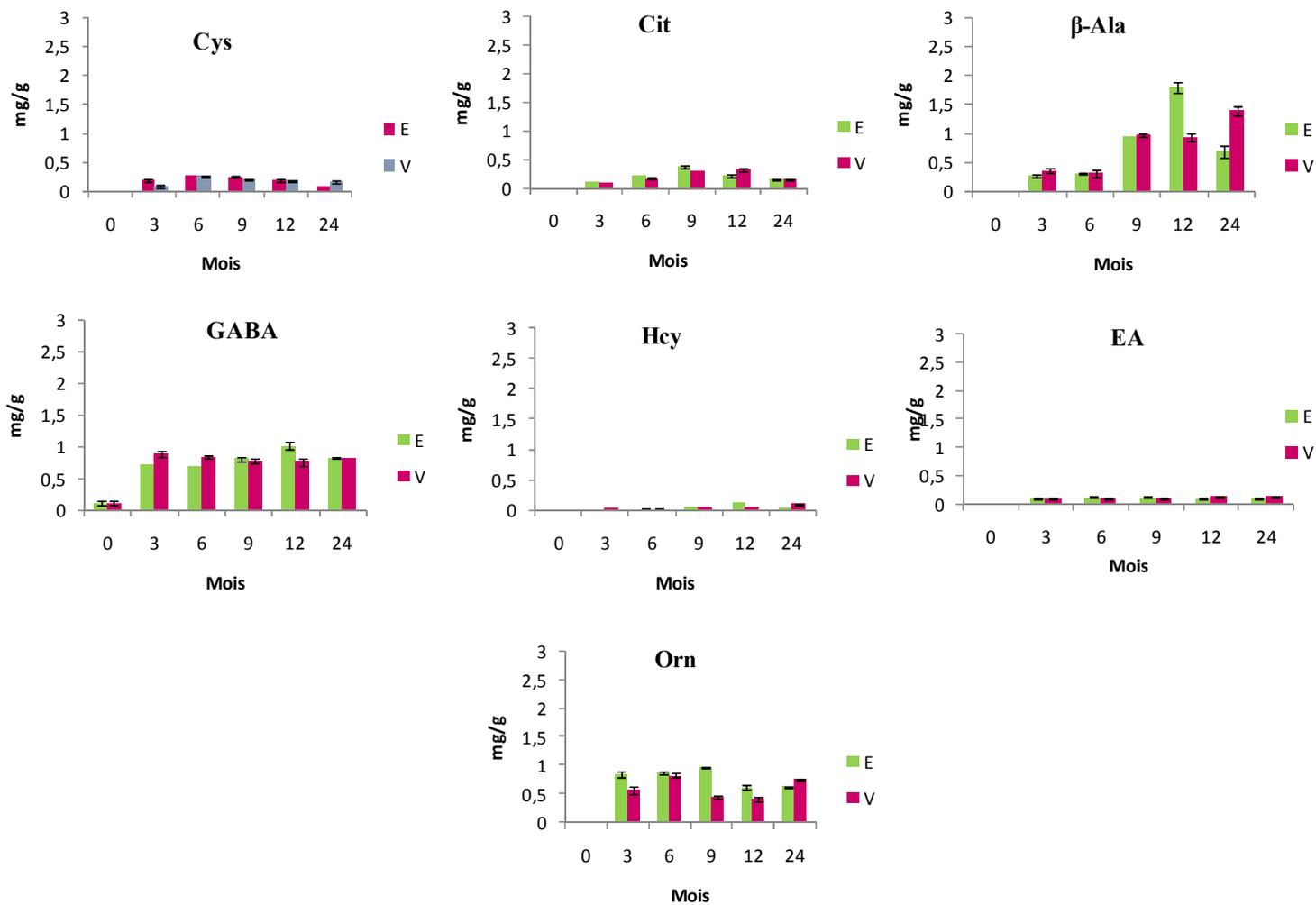


Tableau 22 : Les valeurs *P* de l'ANOVA montrant l'effet du temps et de l'ajout de vinaigre sur la quantité des acides aminés libres.

Acide aminé	Temps	Type d'échantillon	Interaction
Asp	***	ns	ns
Thr	***	ns	**
Ser	***	ns	*
Asn	***	ns	*
Glu	***	ns	***
Gln	***	ns	*
Gly	***	*	ns
Ala	***	***	*
Cit	***	ns	***
Val	***	ns	**
Cys	***	ns	ns
Met	***	**	***
Ile	***	ns	**
Leu	***	*	**
Tyr	***	***	***
β-Ala	***	ns	***
Phe	***	**	***
Hcy	***	ns	***
GABA	***	ns	***
EA	***	ns	**
Orn	***	***	***
Lys	***	***	***
His	***	**	***
Arg	***	***	***
Pro	***	ns	***

*** P< 0,001 ** P<0,01 * P<0,05 ^{ns}P> 0,05

Les acides aminés libres présentent une augmentation marquée au cours de l'affinage. Ils montrent leurs taux maximums à 9 et à 24 mois. A l'inverse, la glutamine a atteint sa concentration maximale après 3 mois de fermentation, puis, sa concentration a diminué jusqu'à la fin de la période de l'affinage quel que soit le type d'échantillon analysé. Par ailleurs, la concentration de l'isoleucine libre dans les échantillons V et E est relativement élevée. En effet, les échantillons V24 et E 24 contiennent respectivement 4,64 et 4,54 mg/kg, alors que la teneur en isoleucine totale du blé non-fermenté (T0) est de 3,52 mg/kg, ce qui représente une augmentation de 31,81 % et de 28,92 %, respectivement, dans les échantillons V24 et E24

Le profil des acides aminés libres est sensiblement influencé par la fermentation. L'analyse de la variance (ANOVA) a montré que leurs concentrations sont significativement affectées par le temps d'affinage (25/25), par l'ajout de vinaigre (10 sur 25), et par les interactions entre les deux facteurs (22 sur 25). En revanche, aucun effet significatif de l'ajout de vinaigre n'est observé en l'absence de l'interaction temps / type d'échantillon (tableau 22 et annexe 13).

L'ACP a présenté les principales différences dans les profils des acides aminés libres de tous les échantillons de blé (figure 37). Les deux premiers axes représentent 88% de la variabilité totale. La CP1, décrivant 75% de la variabilité, est positivement associée à des concentrations élevées de la plupart des acides aminés détectés (figure 37- A). Elle sépare le blé non-fermenté (T0), apparaissant dans la gauche de tous les échantillons. Elle est positivement associée à la plupart des variables (figure 37-B).

La CP2, représentant 13 % de la variabilité, est positivement liée à la glutamine, ce qui explique la position des échantillons E3 et V3, en décalage par rapport à l'ensemble des autres échantillons. A l'exception des échantillons de 12 mois de fermentation, la CP2 sépare les échantillons de blé fermenté jusqu'à 9 mois de ceux de 24 mois d'affinage indépendamment de la présence du vinaigre. La différence observée, au niveau des échantillons E12 et V12, est liée à l'évolution des taux des acides aminés non standards, notamment la β -alanine et l'homocysteine. Leurs concentrations continuent d'augmenter dans les échantillons E12 et diminuent pas contre dans les échantillons V12.

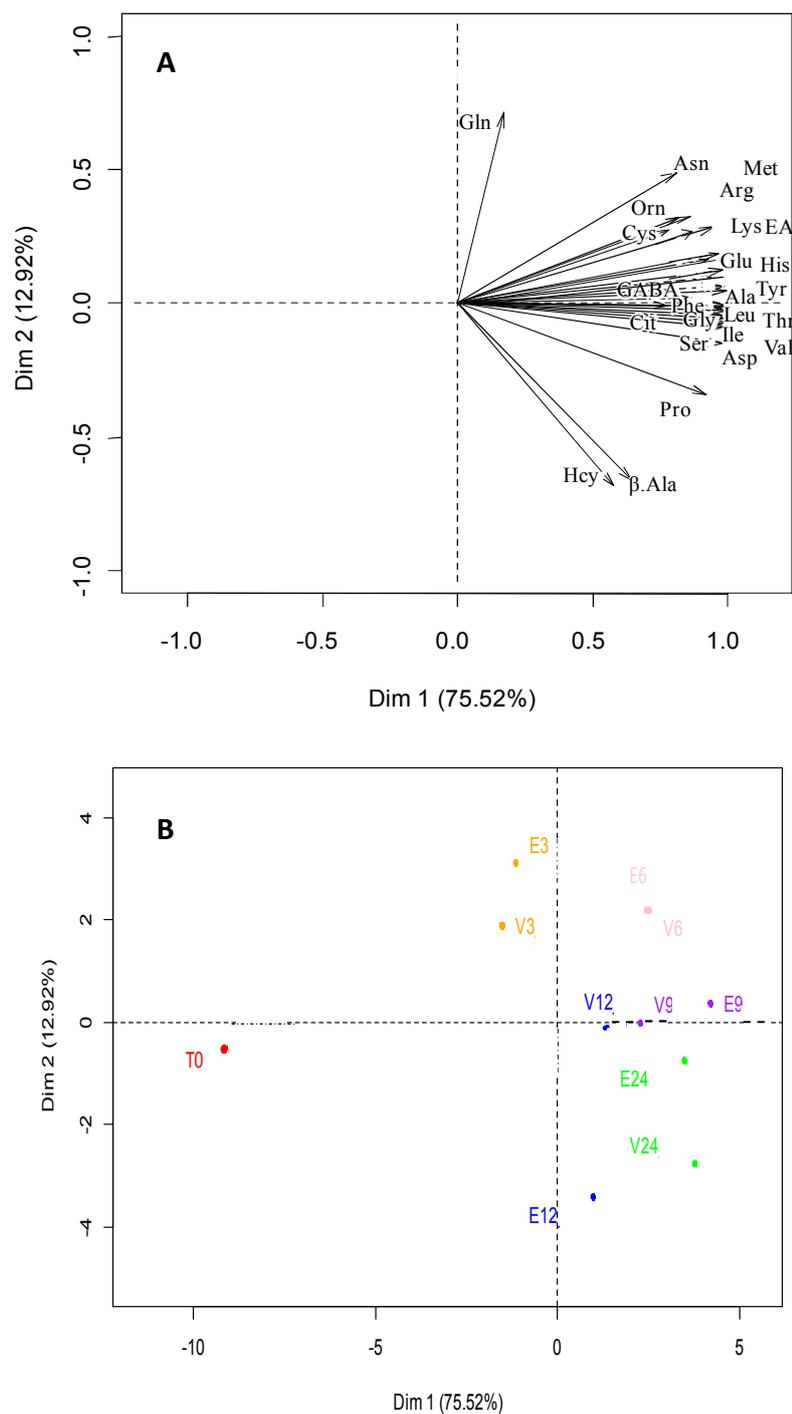


Figure 37: Cartes des facteurs individuels (A) et variables (B) de l'analyse en composantes principales des acides aminés libres dans le blé fermenté avec vinaigre (V) et sans vinaigre (E) pendant 3, 6, 9, 12 et 24 mois.

T0 ; blé non-fermenté.

Tableau 23: Composés volatils identifiés, ion (m/z) de quantification, et les valeurs *P* de l'ANOVA, montrant l'effet du temps et de l'ajout de vinaigre sur leurs quantités.

IR ^a	Composés	m/z	Identification ^b	P, Temps ^c	P, Type d'échantillon ^c	P, Interaction ^c
471	ethanol	31	S, IR, BD	**	**	ns
517	dimethylsulfide (DMS)	62	S, IR, BD	***	***	***
554	propanol	59	IR, BD	***	***	***
556	2-methylpropanal	72	S, IR, BD	***	ns	***
589	2,3-butanedione (diacetyl)	86	S, IR, BD	***	ns	***
597	2-butanone	-	S, IR, BD	*	ns	ns
613	ethylacetate (ethyl C2)	70	S, IR, BD	***	ns	***
622	acide acétique (C2)	60	S, IR, BD	**	ns	ns
659	3-methylbutanal	58	S,IR, BD	***	ns	ns
666	2-methylbutanal	41	S, IR, BD	***	ns	ns
666	1-butanol	55	IR, BD	***	**	***
695	2,3-pentanedione	100	IR, BD	***	**	***
701	pentanal	58	IR, BD	***	ns	ns
712	propylacetate(propyl C2)	61	IR, BD	***	***	***
712	acide propanoïque (C3)	74	S, IR, BD	***	***	***
712	2-butanone-3-hydroxy (acetoin)	45	S, IR, BD	***	**	***
739	3-methylbutanol	70	S, IR, BD	***	**	***
745	2-methylbutanol	57	S, IR, BD	***	***	***
752	dimethyldisulfide (DMDS)	94	S,IR, BD	***	ns	*
766	1-pentanol	55	IR, BD	***	***	***
781	acide butanoïque (C4)	60	S, IR, BD	***	*	***
800	ethyl butanoate (ethyl C4)	116	S, IR, BD	***	***	***
803	hexanal	56	IR, BD	**	ns	**
806	2,3-butanediol	90	IR, BD	ns	ns	ns
811	ethyl2-hydroxypropanoate (ethyl lactate)	75	IR, BD	***	***	***
816	butylacetate (butyl C2)	56	IR, BD	***	ns	***
831	furfural	95	S,IR, BD	***	***	***
836	3-methylbutanoic acid	87	S,IR, BD	***	***	***
845	2-methylbutanoic acid	74	S,IR, BD	***	***	***
859	furanmethanol	98	IR, BD	***	ns	**
871	1-hexanol	69	S, IR, BD	***	ns	ns
876	3-methylbutyl acetate (3-methylbutyl C2)	87	IR, BD	***	ns	***
880	propyl butanoate (propylC4)	71	IR, BD	***	***	***
911	3-methylthiopropional (methional)	48	IR, BD	***	ns	ns
961	benzaldehyde	105	S, IR, BD	***	ns	**
962	Acide hexanoïque (C6)	87	S,IR, BD	**	ns	**
993	butyl butanoate (butyl C4)	89	IR, BD	***	***	***
1056	benzeneacetaldehyde	91	IR, BD	**	ns	ns
1104	nonanal	82	IR, BD	***	***	**
1118	phenylethanol	92	IR, BD	ns	ns	ns

^aIR, indices de rétention Kovats ; ^bComposés identifiés sur la base: S, temps de rétention et spectre de masse des standards ; IR, indice de rétention; BD, base de données des spectres de masse NIST. ^c valeurs p de l'ANOVA: *** P< 0.001 ** P<0.01 * P<0.05 ^{ns}P> 0,05

4.2.3 Composés volatils

L'analyse des échantillons T0, E et V par CPG a permis d'obtenir les 11 chromatogrammes présentés dans la figure 38. Depuis plusieurs signaux générés par composé (m/z par temps de rétention), 1 778 sont produits par XCMS après conversion des données brutes en temps et en masse d'alignement des pics chromatographiques, correspondant à environ 60 différents composés. Les molécules non odorantes (alcanes, alcènes, et autres) et des contaminants, tels que le trichlorométhane, ne sont pas retenus dans l'ensemble des données. En final, 40 composés aromatiques sont identifiés, dont dix alcools, neuf aldéhydes, huit esters, six acides, quatre cétones, et trois composés soufrés (tableau 23).

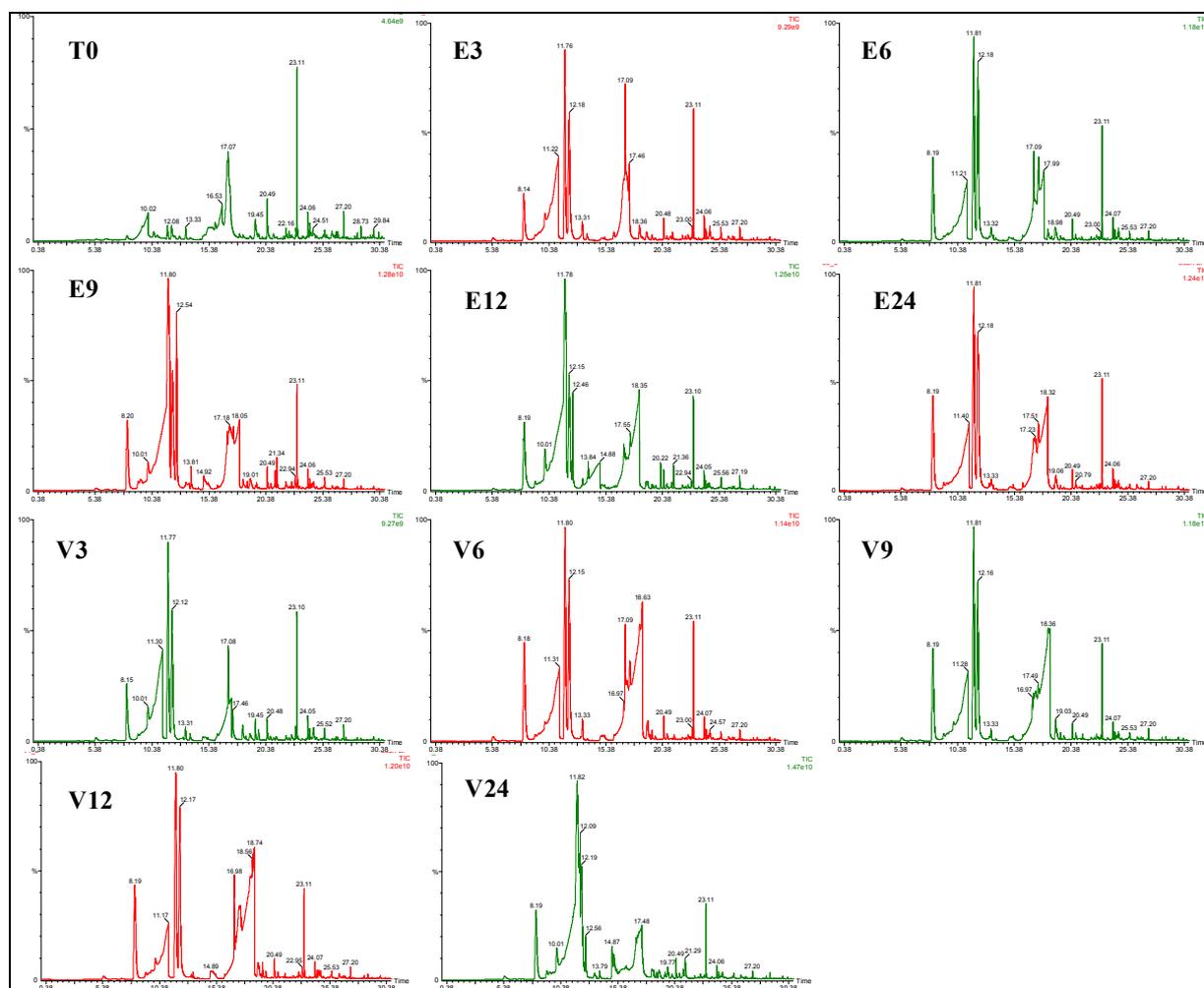


Figure 38 : Chromatogrammes des 11 échantillons analysés par la CPG/SM.

E ; blé fermenté sans vinaigre, V ; blé fermenté avec vinaigre, T0 ; blé non-fermenté. 3, 6, 9, 12, 24 ; temps de fermentation en mois

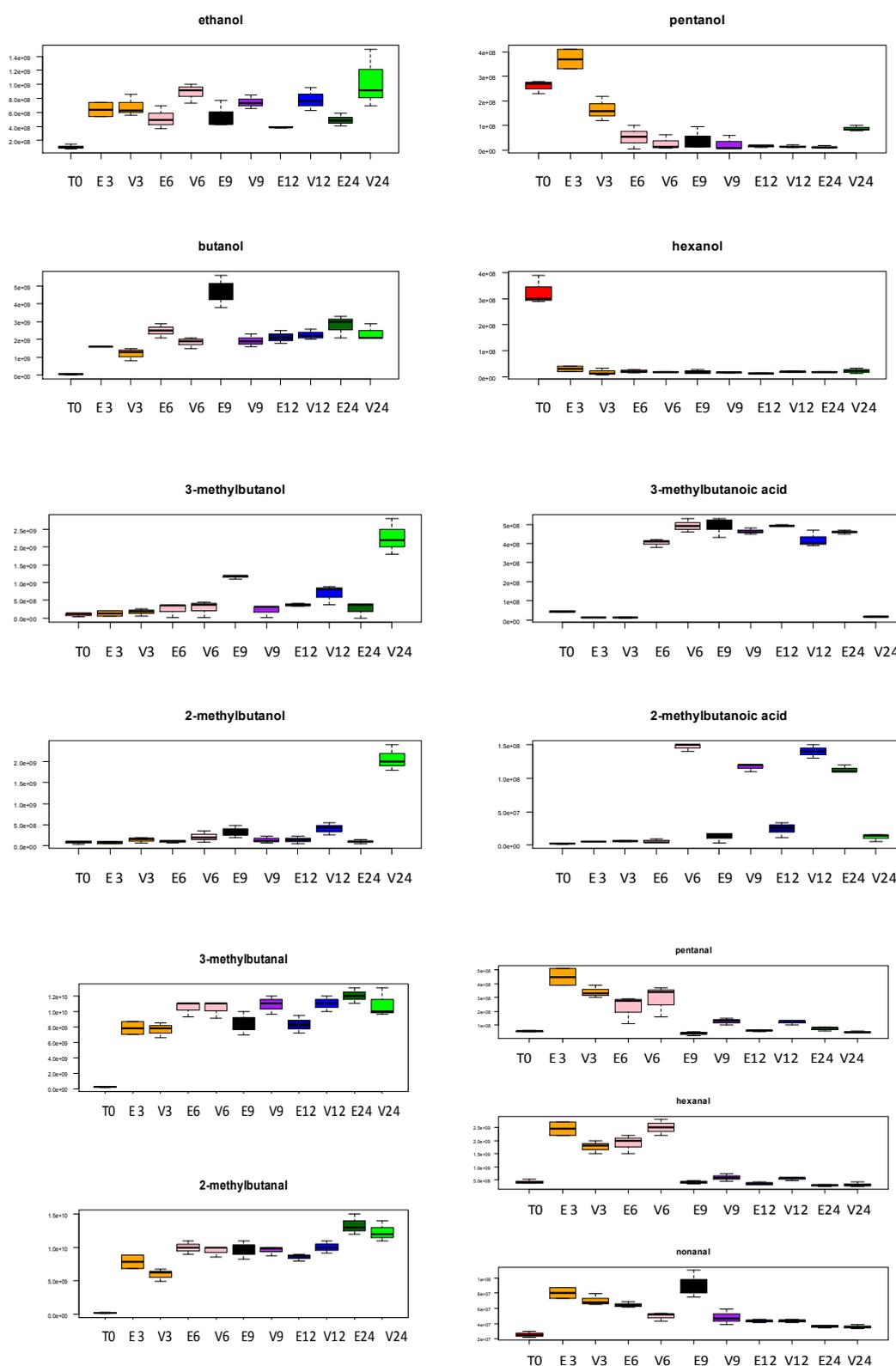


Figure 39 : Abondances, au cours de la fermentation, des alcools et des aldéhydes identifiés par CPG/SM.

E ; blé fermenté sans vinaigre, V ; blé fermenté avec vinaigre, T0 ; blé non – fermenté. 3, 6, 9, 12, 24 ; temps de fermentation en mois.

Le profil des composés aromatiques volatils est sensiblement affecté par la fermentation. Leur abondance est 30 fois plus élevée (35 sur 40), en moyenne, dans les échantillons de blé fermentés par rapport au blé non-fermenté (figures 39,40 et 41). L'analyse de la variance (ANOVA) a montré que la quantité de la plupart d'entre eux est significativement affectée par le temps d'affinage (38 sur 40), par le type d'échantillons (20 sur 40), et par les interactions entre les deux éléments (28 sur 40) (tableau 23). En revanche, un effet significatif lié à l'ajout de vinaigre, est observé avec l'absence de l'interaction temps \times type d'échantillon pour un seul composé ; l'éthanol (tableau 23). Il est détecté à un taux plus élevé (1,7 fois en moyenne) dans le blé fermenté V. Plus de la moitié des composés présentent une augmentation marquée au cours de l'affinage (> 10 fois). Les aldéhydes à chaîne droite (pentanal, l'hexanal, et nonanal) montrent leurs taux maximums au 3^{ème} et au 6^{ème} mois de la fermentation, puis, leurs concentrations diminuent jusqu'à la fin. A l'inverse, certains acides, tels que l'acide butanoïque, l'acide 2-méthylbutanoïque, et l'acide 3-méthylbutanoïque, atteignent leurs concentrations maximales qu'après 12 mois de fermentation, quel que soit le type d'échantillon utilisé (E ou V).

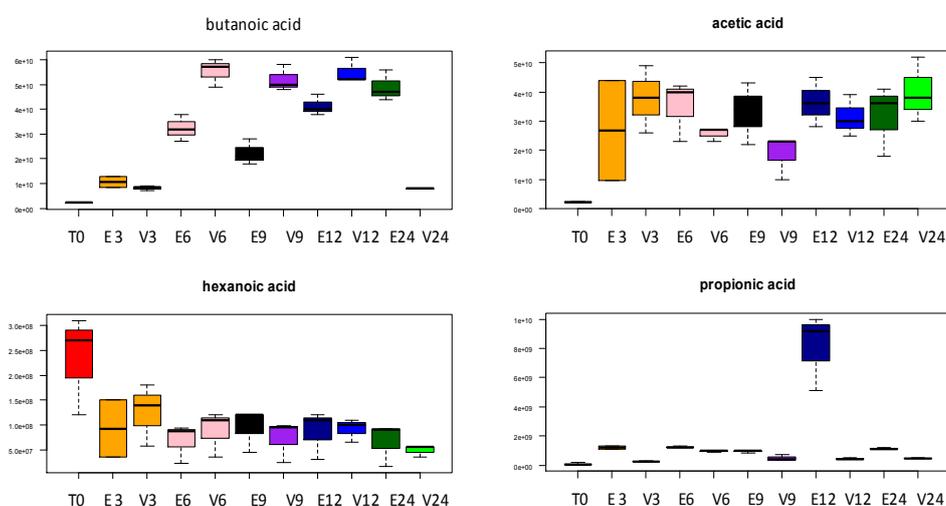


Figure 40 : Abondances, au cours de la fermentation, des acides organiques identifiés par CPG/SM.

E ; blé fermenté sans vinaigre, V ; blé fermenté avec vinaigre, T0 ; blé non – fermenté. 3, 6, 9, 12, 24 ; temps de fermentation en mois.

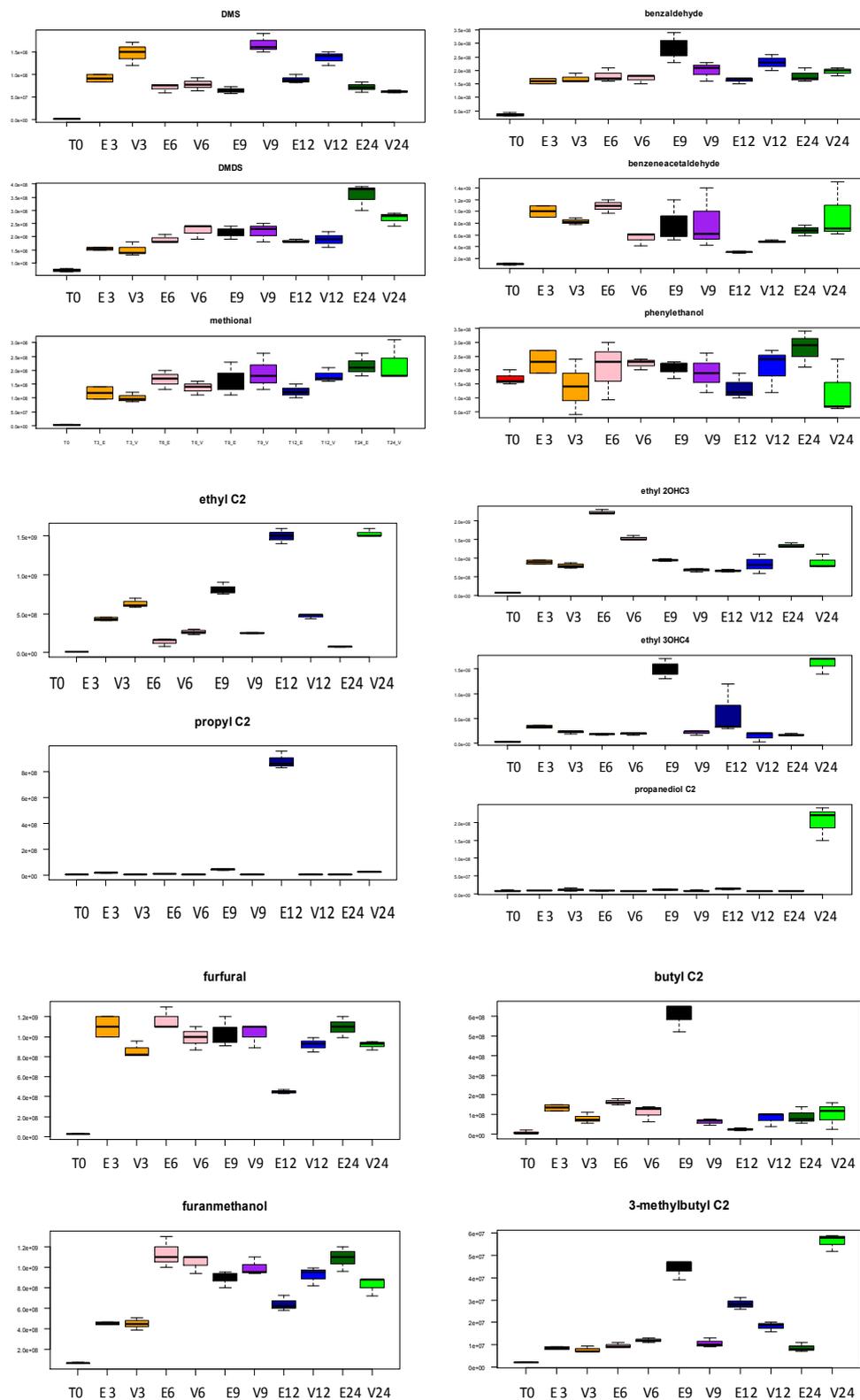


Figure 41 : Abondances, au cours de la fermentation, des composés soufrés et aromatiques identifiés par CPG/SM.

E ; blé fermenté sans vinaigre, V ; blé fermenté avec vinaigre, T0 ; blé non – fermenté. 3, 6, 9, 12, 24 ; temps de fermentation en mois.

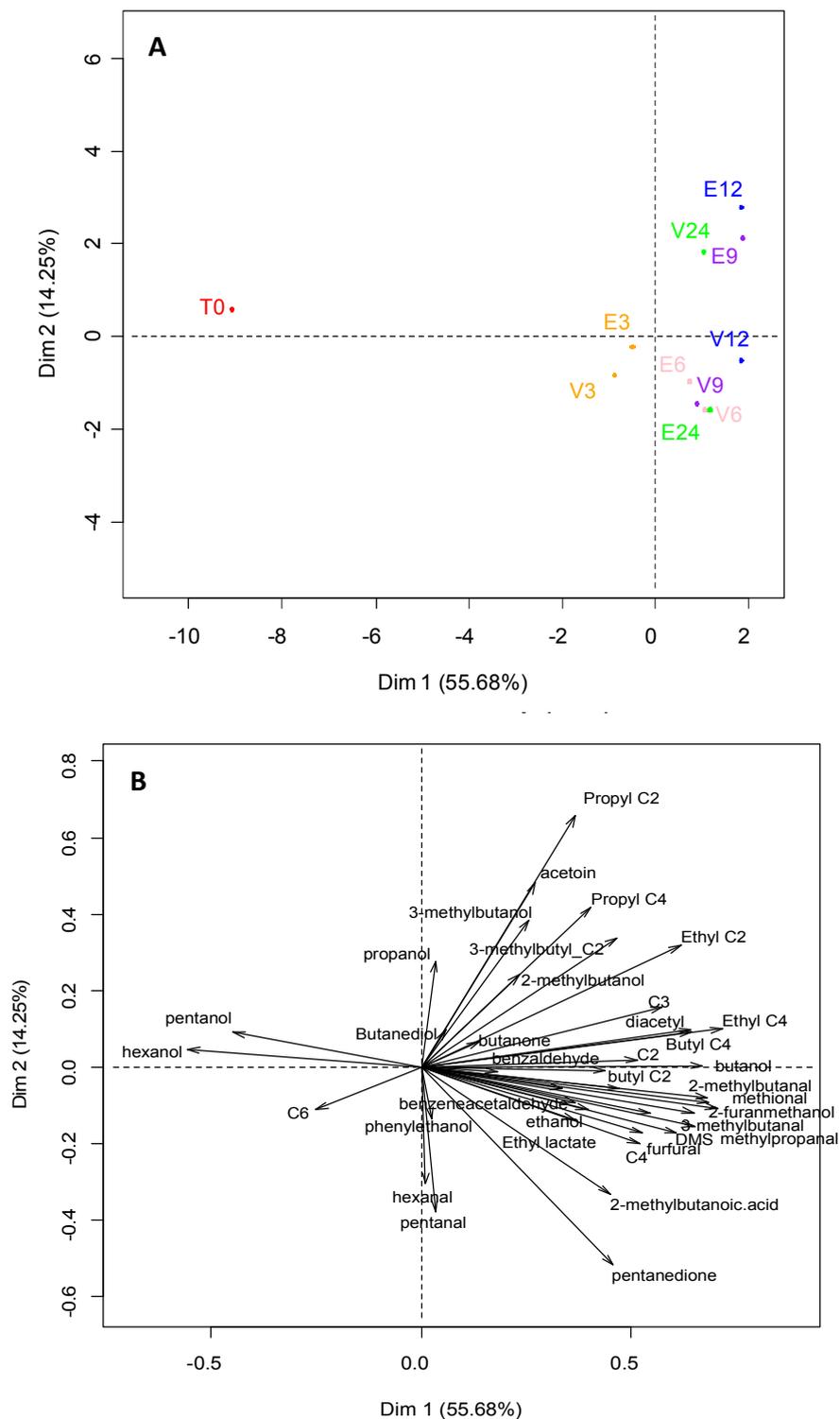


Figure 42: Cartes des facteurs individuels (A) et variables (B) de l'analyse en composantes principales de 40 composés aromatiques volatils, produits dans le blé fermenté avec vinaigre (V) et sans vinaigre (E) pendant 3, 6, 9, 12 et 24 mois.

Le blé non-fermenté est représenté par T0. Les noms de certains volatils sont simplifiés suivant le tableau 21.

Les principales différences dans les profils des volatils, de tous les échantillons de blé, sont illustrées dans l'ACP (figure 42). Les deux premiers axes représentent 70% de la variabilité totale. La CP1, décrivant 55 % de la variabilité, est positivement associée à des concentrations élevées de la plupart des matières volatiles, notamment des acides, des esters, des composés soufrés et de diacétyle, tandis que les alcools (1-pentanol et 1-hexanol) et l'acide hexanoïque sont négativement associés à la CP1. Elle sépare le blé non-fermenté (T0), apparaissant dans la gauche de tous les échantillons et elle est positivement associée à la plupart des variables.

La CP2, représentant 14 % de la variabilité, est positivement liée à de nombreux esters et alcools à chaînes ramifiées. Elle est négativement corrélée avec l'acide butanoïque, les acides à chaînes branchées et le 2,3-pentanedione. La CP2 sépare les échantillons de blé fermenté jusqu'au 6^{ème} mois, au moins, indépendamment des échantillons E et V. Par exemple, les échantillons sans vinaigre (E9) et avec vinaigre (V24) sont situés à la fois dans le quart supérieur droit. Ces deux échantillons contiennent significativement plus de 3-méthylbutanol, un ester de cet alcool (l'acétate de 3- méthylbutyle) et le diacétyle, par rapport aux autres. L'échantillon de blé sans vinaigre (E12) contient beaucoup plus de propanol et les deux esters correspondants (acétate et butanoate de propyle). La CP3, qui représente 12 % de la variabilité, est positivement liée à des aldéhydes à chaînes droites (pentanal, hexanal, et nonanal) correspondants aux échantillons de 3 et 6 mois de fermentation (Annexe 14).

4.2.4 Activité enzymatique

Plusieurs activités enzymatiques liées aux métabolismes des lipides, des glucides et des protéines sont étudiées. Le test API-ZYM est utilisé pour étudier les profils enzymatiques de 24 souches présélectionnées, appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Weissella* (tableaux 24, 25, 26 et 27). Les résultats ont montré des variations inter et intraspécifiques.

Toutes les souches, des espèces testées, ont exhibé une activité peptidolytique positive de la leucine arylamidase, de la valine arylamidase et de la cystine arylamidase, à l'exception des souches *P. pentosaceus* V9-149 et *Leu. mesenteroides* E3-70 qui n'ont pas produit de leucine arylamidase et valine arylamidase respectivement.

Tableau 24 : Activités hydrolytiques de *Lactobacillus* spp., déterminées par la galerie API-ZYM.

	<i>L. buchneri</i> E12-1	<i>L. coryniformis</i> V9-145	<i>L. coryniformis</i> V9-141	<i>L. brevis</i> E6-120	<i>L. brevis</i> E12-8	<i>L. rapi</i> E3-63	<i>L. namurensis</i> E24-162	<i>L. curvatus</i> V3-84	<i>L. pentosus</i> V9-148
Phosphatase alcaline	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Esterase (C4)	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Esterase lipase (C8)	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Lipase (C14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cystine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trypsine	+	-	-	-	-	-	-	+	-
α -chymotrypsine	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Phosphatase acide	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolise	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -galactosidase	+	-	-	+	+	+	+	-	+
β - galactosidase	+	-	-	+	+	+	+	-	+
β -glucuronidase	+	-	-	-	+	+	-	-	-
α -glucosidase	+	+	+	+	+	+	+	-	+
β -glucosidase	+	+	+	+	+	+	+	-	+
N-acetyl- β -glucoaminidase	+	-	+	-	-	-	-	-	+
α -mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+/- ; peu d'activité.

Par ailleurs, les activités protéolytiques de l' α - chymotrypsine et/ou de la trypsine ne sont présentes que chez 9 souches sur l'ensemble des 24 testées ; *L. buchneri* E12-1, *L. curvatus* V3-84, *P. pentosaceus* V9-149, *E. faecium* V3-82, *E. faecium* V12-20, *Leu. falax* V3-91, et *W. paramesenteroides* V3-99.

Trois souches seulement des 24 testées (*P. pentosaceus* V6-111, *Leu. falax* V3-91, et *W. paramesenteroides* V3-99) sont dotées d'une activité lipolytique (C14), à la différence d'autres activités lipolytiques telles que les estérases (C4) et l'estérase-lipase (C8) qui étaient présentes dans la plupart d'entre elles.

Les activités de la β et de l' α -galactosidase sont enregistrées pour 6 souches de *Lactobacillus* spp., sur les 9 testées. Cependant pour les souches des autres espèces étudiées, une seule de ces deux activités est présente, alors que 5 sont dépourvus des activités des galactosidases, dont 3 sont des lactobacilles. La majorité des souches a montré une activité β -glucosidase (sauf *L. curvatus* V3-84, *P. pentosaceus* V9-149, *E. faecium* V3-82, *E. faecium* V12-20, *Leu. falax* V3-91 et *W. paramesenteroides* V3-99), tandis que le nombre de souches avec une activité α -glucosidase est significativement inférieur (11 souches, principalement des lactobacilles).

Tableaué 25: Activités hydrolytiques de *Pédiococcus* spp., déterminées par la galerie API-ZYM.

	<i>P. pentosaceus</i> E3-76	<i>P. pentosaceus</i> E3-68	<i>P. pentosaceus</i> E24-160	<i>P. pentosaceus</i> V3-98	<i>P. pentosaceus</i> V6-111	<i>P. pentosaceus</i> V9-149	<i>P. pentosaceus</i> V12-50	<i>P. acidilactici</i> E3-73	<i>P. acidilactici</i> V12-49
Phosphatase alcaline	-	-	+	+/-	-	-	-	+	+
Esterase (C4)	-	+	+	+/-	+	-	-	+	+
Esterase lipase (C8)	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Lipase (C14)	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Valine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cystine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trypsine	-	-	-	-	-	+	-	-	-
α -chymotrypsine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
phosphatase acide	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolyse	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -galactosidase	-	-	-	+	-	+	-	-	-
β - galactosidase	+	+	+	+	+	-	-	+	+
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidase	-	-	-	+	-	-	-	-	+
β -glucosidase	+	+	+	+	+	-	+	+	+
N-acetyl- β -glucoaminidase	+	+	+	+	+	-	+	+	+
α -mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	+
α -fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+/- ; peu d'activité.

Tableau 26 : Activités hydrolytiques d'*Enterococcus* spp., déterminées par la galerie API-ZYM.

	<i>E. faecium</i> V3-82	<i>E. faecium</i> V12-20	<i>E. hirae</i> V3-95
Phosphatase alcaline	-	-	+
Esterase (C4)	+	+	+
Esterase lipase (C8)	+	+	+
Lipase (C14)	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+
Valine arylamidase	+	+	+
Cystine arylamidase	+	+	+
Trypsine	+	+	-
α -chymotrypsine	-	-	-
phosphatase acide	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolyse	+	+	-
α -galactosidase	-	-	-
β - galactosidase	+	+	-
β -glucuronidase	-	-	-
α -glucosidase	-	+	-
β -glucosidase	-	-	+
N-acetyl- β -glucoaminidase	-	-	+
α -mannosidase	-	+	-
α -fucosidase	-	+/-	+/-

Tableau 27 : Activités hydrolytiques des *Leuconostoc* spp., et de *W. paramesenteroides* V3-99 déterminées par la galerie API-ZYM.

	<i>Leu. mesenteroides</i> E3-70	<i>Leu. falax</i> V3-91	<i>W. paramesenteroides</i> V3-99
Phosphatase alcaline	-	-	-
Esterase (C4)	+	+	+
Esterase lipase (C8)	-	+	+
Lipase (C14)	-	+	+
Leucine arylamidase	+	+	+
Valine arylamidase	-	+	+
Cystine arylamidase	+	+	+
Trypsine	-	+	-
α -chymotrypsine	-	+	+
phosphatase acide	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolyse	+	+	-
α -galactosidase	+	+	+
β - galactosidase	+	+	-
β -glucuronidase	-	-	-
α -glucosidase	+	+	-
β -glucosidase	+	-	-
N-acetyl- β -glucoaminidase	-	-	+
α -mannosidase	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-

+/- ; peu d'activité.

4.3 Discussion

L'analyse des caractéristiques physico-chimiques du blé fermenté a montré l'augmentation de l'AT et une diminution du pH. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés sur les différentes fermentations à base de céréales (Mugula *et al.*, 2003; Tou *et al.*, 2006; Yousif *et al.*, 2010). Ceci est dû au métabolisme des BL, dont la fonction principale est d'assurer la première acidification du produit par la fermentation des hydrates de carbone en acides organiques ; ce qui contribue à la base, à l'agréable goût acide de nombreux aliments fermentés. De plus, l'accumulation des acides organiques qui se traduit par de faibles valeurs de pH est essentielle dans la conservation et l'inhibition des pathogènes (Humblot and Guyot, 2008).

Dans la présente étude, l'AG et la matière grasse ont également augmenté de manière significative au cours de la fermentation et dans les deux types d'échantillons. Les BL sont considérées comme faiblement lipolytiques par rapport à d'autres bactéries (De Roissart and Luquet, 1994). Cependant, leur présence dans les aliments fermentés pendant de longues périodes peuvent les amener à libérer des quantités appréciables d'acides gras libres (Collins *et al.*, 2003). Dans notre étude, des souches testées des différentes espèces isolées sont dotées d'activités estérases/estérases-lipase (C4 et C8) et trois seulement de lipase (C14). La lipolyse est importante dans le développement de l'arôme dans les produits fermentés, en particulier pendant l'affinage. Plusieurs BL comme *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *L. casei*, *L. plantarum* et *L. rhamnosus*, ont été rapportés ayant une des activités lipolytiques (Endo and Dicks, 2014).

Par ailleurs, l'extraction des lipides favorise celle des lipides libres (non liés à l'amidon) localisés surtout au niveau du germe et de la couche d'aleurone (Saulnier, 2012). La fraction liée à l'amidon est probablement libérée au cours de la fermentation grâce aux activités amylolytiques des BL et des enzymes endogènes, ce qui pourrait expliquer l'augmentation des teneurs en matières grasses du blé fermenté comparé au blé non-fermenté.

La diminution des taux d'amidon dans les échantillons E et V n'est pas surprenante, car l'amidon est la principale source de carbone et de sucres simples fermentescibles. Son hydrolyse est assurée par les activités enzymatiques endogènes du grain de blé et des BL amylolytiques (Guyot, 2010, 2012; Gänzle, 2014). Nos résultats ont révélé que tous les lactobacilles isolés (sauf *L. curvatus* V3-84) des échantillons E et V sont les principaux

producteurs de l'enzyme amylolytique débranchante ; l' α -glucosidase (DexB). La distribution généralisée des gènes de la DexB et d'autres enzymes similaires, dans les génomes des lactobacilles comme *L. sanfranciscensis* et *L. reuteri* des levains, a été rapportée et implique un rôle essentiel dans le métabolisme des glucides des lactobacilles associées aux céréales fermentées (Gänzle and Follador, 2012).

L'évolution décroissante des concentrations en protéines pendant les premiers mois de fermentation est liée à leur utilisation par les BL comme source d'azote, nécessaire à leur métabolisme de croissance. Par ailleurs, l'augmentation des teneurs en protéines à partir du 9^{ème} mois est probablement due à l'accumulation d'acides aminés et d'autres produits azotés issus du métabolisme des BL. En effet, la méthode Kjeldahl permet de quantifier l'azote après minéralisation. Les teneurs en protéines, obtenues après conversion par le facteur, peuvent contenir de l'azote non protéique.

L'effet de la fermentation des céréales sur les concentrations en protéine est un sujet controversé. De nombreux travaux sur des produits fermentés à base de maïs, de millet, et de sorgho ont rapportés que la fermentation améliorerait considérablement leur qualité en protéines, par contre d'autres études sur la *kisra* de sorgho et le *uji* (bouillie de maïs, de sorgho, ou de millet) ont montré l'inverse ou aucun effet (Blandino *et al.*, 2003).

Dans les échantillons E et V, les concentrations de tous les acides aminés libres (sauf la glutamine) ont significativement augmenté au cours de toute la période d'affinage. L'hydrolyse des protéines dépend de l'activité catabolique des BL et des enzymes des céréales. L'acidification augmente la solubilité des protéines du gluten et leur susceptibilité à l'hydrolyse enzymatiques. La fermentation engendre la chute du pH à l'optimum des protéases aspartiques, majeure protéase endogène des grains de blé, et les lactobacilles augmentent la concentration en acides aminés libres principalement par les peptidases intracellulaires spécifiques de la souche (Juillard *et al.*, 1995).

La désamination de la glutamine donne le glutamate et l'inter-conversion du glutamate- α -cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase, fournit les accepteurs d'amines pour la transamination d'autres acides aminés. L'accumulation de glutamate à partir de la conversion de la glutamine est rapportée par de nombreux auteurs, notamment dans la fermentation au levain par *L. reuteri* et *L. sanfranciscensis* (Gänzle *et al.*, 2007).

Les profils enzymatiques des 24 souches sélectionnées ont montré que la majorité des espèces isolées présentent d'importantes aptitudes peptidolytiques. En effet, de nombreux lactobacilles des céréales fermentées, ont été rapportés disposer de ces activités (Sanni *et al.*, 2002; Songré-Ouattara *et al.*, 2008; Brandt, 2015). La dégradation des protéines par les BL 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).

Autres acides aminés, notamment l'ornithine, la β -alanine et le GABA, ne résultants pas de l'hydrolyse des protéines du blé, sont exclusivement générés par le métabolisme bactérien. Nos résultats montrent une augmentation significative de l'ornithine, dès les premiers mois de la fermentation. L'ornithine est un précurseur du 2-acétyl-1-pyrroline, composé clé de l'arôme caractéristique de la croûte du pain de blé. L'ornithine dans le blé, est dérivée du métabolisme de l'arginine par des lactobacilles. *L. amylolyticus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. frumenti*, *L. pontis*, *L. reuteri*, *L. sakei*, et quelques souches de *L. sanfranciscensis* convertissent l'arginine en ornithine via la voie de l'arginine-déiminase (ADI). La voie de l'ADI contribue à l'homéostasie du pH et à la tolérance de l'acidité par les lactobacilles, grâce aux deux protons consommés (Gänzle *et al.*, 2007; Vrancken *et al.*, 2009).

La concentration de GABA a augmenté, dans tous les échantillons, dès les premiers mois de la fermentation. Les teneurs en GABA dans les échantillons E et V sont en moyenne estimées, respectivement, à 810 mg/kg et à 820 mg/kg. Le GABA, composé bioactif, agit en tant que principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Il a aussi des effets antihypertenseurs, diurétiques et tranquillisants, et prévient contre le diabète (Rizzello *et al.*, 2008). La synthèse de GABA dans les aliments fermentés est rapportée par de nombreux auteurs, y compris dans les produits fermentés à base de céréales. Le glutamate décarboxylase est l'enzyme qui catalyse la conversion du L-glutamate (ou ses sels) en GABA, à travers une seule étape de α -décarboxylation. *L. plantarum* C48 et *Lactococcus lactis* PUI ont été utilisées dans la fermentation au levain des céréales. La concentration de GABA dans le mélange fermenté au levain (504 mg/kg), était nettement supérieure à celle trouvée pour le mélange fermenté avec de la levure de boulanger (Gobbetti *et al.*, 2013). Une quantité abondante de GABA a également été observée pendant la fermentation au levain, de blé dur dépourvu de son (Rizzello *et al.*, 2012) et de germe de blé (Rizzello *et al.*, 2010).

La fermentation du blé, dans nos échantillons, a généré un nombre élevé de composés, associés à diverses notes aromatiques. Ces composés dérivent de la conversion des constituants alimentaires par l'intermédiaire d'une série de réactions biochimiques catalysées principalement par les enzymes endogènes et les enzymes microbiennes.

Les sucres réducteurs et les acides aminés libres sont des précurseurs d'arômes importants. Seuls quelques acides aminés ont cette caractéristique ; la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la phénylalanine, la proline et l'ornithine (Gänzle *et al.*, 2007). En général, les aldéhydes produits par les BL sont souvent réduits en alcools correspondants. Un autre groupe de composés avec une grande influence sur l'impression aromatique globale est dérivé de la dégradation des lipides. Ceci est souvent initié par la lipoxygénase des plantes (Brandt, 2015).

Le diacétyl et le 2, 3-pentanedione dérivent de la fermentation de certaines sources de carbone comme le citrate et sont associés à des notes de beurre (Mallia *et al.*, 2008). Le diacétyl est largement produit par les BL, comme les espèces des genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*. L'éthanol et l'acide acétique sont produits à partir de la fermentation des sucres par des espèces de BL hétérofermentaires telles que *L. brevis*, *L. buchneri*, et *Leu. mesenteroides* détectées dans la présente étude. Le catabolisme des chaînes ramifiées des acides aminés aromatiques et de la méthionine par les BL génère divers composés aromatiques comme les acides, les alcools, les aldéhydes, qui produisent une variété de notes aromatiques (Yvon and Rijnen, 2001). Par exemple, les aldéhydes à chaîne ramifiée et les acides à chaîne ramifiée, résultants de la dégradation des acides à chaîne ramifiée, sont associés respectivement aux notes de malt et de fromage.

Le méthanol et le disulfure de diméthyle (DMDS) résultent des acides aminés soufrés et sont associées, respectivement, aux notes de pommes de terre cuites et aux notes sulfurées. La gamme d'acides et alcools produits offre un potentiel de substrats pour les réactions d'estérification catalysées par les estérases des BL (Holland *et al.*, 2005). Beaucoup d'esters, associés aux saveurs fruitées, sont détectés dans nos échantillons. Leur formation dans le blé fermenté a probablement été limitée par la quantité d'alcools. En effet, nous avons observé des corrélations significatives entre la présence de certains alcools (propanol et le butanol) et les esters correspondants.

La fermentation a affecté tous les paramètres analysés des échantillons E et V, avec une interaction temps × type d'échantillons significative. En d'autres termes, il n'est pas possible de conclure sur un effet global de l'addition de vinaigre. Les profils des volatils, des acides aminés libres et de la composition du blé fermenté sont semblables, dans l'ensemble, quelle que soit le type d'échantillons (E ou V).

Les modifications tardives de la matrice du blé fermenté, survenues dans les échantillons de 24 mois, suggèrent que la population bactérienne viable et métaboliquement active est probablement présente en plus grand nombre par rapport à la population cultivables détectée dans nos échantillons. La présence dans les aliments des BL VBNC a été démontrée, par exemple, dans le fromage (Falentin *et al.*, 2012) et les plantes (Todorov and Franco, 2010).

4.4 Conclusion

Ce chapitre nous a permis de décrire les transformations physico-chimiques apportées au blé fermenté. Les profils des acides aminés libres et des composés volatils identifiés ont montré un effet marqué de la fermentation, par rapport au blé non-fermenté (utilisé comme témoin). Les acides aminés, non protéinogènes, générés par le métabolisme bactérien constituent des précurseurs importants de composés aromatiques et bioactifs.

Les souches des BL ont manifestés des activités enzymatiques intéressantes notamment peptidolytiques (leucine arylamidase, valine arylamidase et cystine arylamidase) et estérase-lipase (C4, C8 et C14). La sélection de starters spécifiques, sur la base des profils enzymatiques, peut contribuer à accélérer l'affinage et l'obtention d'un produit final avec les caractéristiques sensorielles et organoleptiques recherchées.

***DISCUSSION GENERALE ET
CONCLUSION***

L'objectif principal de notre travail était de caractériser le microbiote, la matrice du blé fermenté et leur interaction, selon le nouveau procédé de fermentation à l'extérieur du *matmor*. Cette étude est entamée par une enquête au niveau de 9 communes des wilayas de : Constantine, Mila, Oum el Bouaghi et Khenchela, connues par les cultures céréalières. Elle visait à recueillir les informations sur les conditions du nouveau procédé au près des artisans et des commerçants des produits céréaliers et des aliments traditionnels.

L'analyse des principaux résultats de l'enquête a permis la reproduction expérimentale de la fermentation, avec deux types d'échantillons de blé ; avec addition initiale de vinaigre (V) et sans vinaigre (E). Le blé a subi une fermentation de 24 mois en atmosphère confinée (Dans des jerrycans en plastique). Les échantillons E et V sont récupérés, tous les trois mois, durant toute la période et ensuite analysés.

Les communautés microbiennes présentes (champignons filamenteux, levures et BL) des 11 échantillons E et V, sont isolées et dénombrées par les méthodes microbiologiques culturelles classiques. Le procédé fermentaire a entraîné la disparition de la flore fongique au cours du temps, permettant un assainissement de la matière première et l'installation d'une flore lactique dominante à l'origine de la fermentation du blé. Ces résultats viennent confirmer, les informations rapportées dans la littérature, que les BL sont les actrices principales de la fermentation des aliments à base de céréales (Jespersen, 2003; Humblot and Guyot, 2008; Guyot, 2010; Tamang, 2010c).

La combinaison des méthodes moléculaires culture-indépendantes (PCR-TTGE) et culture-dépendantes (séquençage des gènes ARNr 16S / *pheS* / *rpoA*, PCR espèce-spécifique), ont permis de caractériser la flore lactique dominante. 69 isolats des échantillons E et V sont identifiés. Ils appartiennent à 16 espèces représentés par 6 genres (*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, et *Streptococcus*). Ces résultats sont en accords avec beaucoup de travaux de recherches sur la fermentation des céréales ; ces genres sont reconnus souvent à l'origine de ce type de fermentation, notamment les genres *Lactobacillus* et *Pediococcus* (Humblot and Guyot, 2008; Tamang, 2010a; f).

La TTGE a révélé des profils très similaires pour les deux échantillons E et V, caractérisée par deux phases. Dans la première (3-12 mois), les profils de la TTGE ont présenté une faible complexité, constitués principalement de trois bandes. A partir du 24^{ème} mois, les échantillons provenant sont caractérisés par un motif de la TTGE plus complexe

composé de 5 à 6 bandes dont les trois principales bandes. La comparaison avec la base de données a permis d'assigner la bande prédominante à *P. pentosaceus*, ce qui concorde avec les résultats obtenus par les méthodes cultures-dépendantes.

Dans la présente étude nous avons mis en évidence la grande diversité des espèces des BL isolées. Certaines de ces espèces comme *L. rapi*, *L. buchneri*, *L. namurensis*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, et *L. pentosus* n'ont pas été auparavant détectés dans des fermentations similaires. Le typage des souches de *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., et *Enterococcus* spp., par la RAPD et la PFGE, a indiqué une importante diversité intraspécifique. Toutefois le niveau de diversité clonale des isolats semble diminuer avec le temps, probablement au bénéfice des souches les plus adaptées aux conditions du procédé.

L'analyse de la composition et des caractéristiques physico-chimiques du blé fermenté a présenté un effet marqué de la fermentation du blé par rapport au blé non-fermenté (utilisé comme témoin), caractérisée principalement par l'augmentation de l'AG, de l'AT et la diminution du pH. Les profils des acides aminés libres et les composés volatils sont évalués en utilisant respectivement la chromatographie d'échange de cations et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). 40 composés aromatiques volatils et 25 acides aminés libres sont identifiés. Ces deux profils sont corrélés ensemble car, la production des composés volatils et aromatiques est intimement liée au métabolisme des acides aminés (Gänzle *et al.*, 2007).

Autres acides aminés, ne résultants pas de l'hydrolyse des protéines du blé exclusivement générés par le métabolisme bactérien sont synthétisés. Nos résultats montrent une augmentation significative de l'ornithine et de GABA, qui sont des précurseurs importants de composés aromatiques et/ou bioactifs (Gänzle *et al.*, 2007; Rizzello *et al.*, 2008; Vrancken *et al.*, 2009).

Les activités hydrolytiques des espèces des BL isolées appartenant à 24 souches différentes, déterminées par le kit APIZYM, ont indiqué qu'elles sont dotées d'une grande diversité des activités enzymatiques, notamment peptidolytiques et lipolytiques. La présence de fortes activités (peptidolytiques et estérases-lipases), sont des traits de qualité, souhaitables pour leur utilisation dans la production d'arôme typique (Tamang, 2010d).

Cette première étude sur le blé fermenté *lemzeiet*, selon le nouveau procédé, a permis d'atteindre les objectifs fixés au départ, à savoir la reproduction du nouveau procédé, la caractérisation du microbiote, et l'analyse de la matrice et de son interaction avec la flore dominante. Au terme de ce travail de thèse, plusieurs perspectives pourraient être envisagées afin d'approfondir les connaissances sur le microbiote et son interaction avec la matrice du blé :

- Il serait d'un grand intérêt de poursuivre l'étude de la dynamique des BL dans un nombre plus élevé d'échantillons au cours des premiers stades de la fermentation lorsque l'équilibre entre les espèces se produit.
- Explorer davantage le microbiote du blé fermenté par l'analyse métagénomique de séquençage à haut débit, pour décrire les espèces sous dominantes, minoritaires ou non cultivables, indétectables par les méthodes culturales classiques et d'empreintes moléculaires comme la PCR-TTGE /DGGE ;
- Il serait aussi intéressant d'étudier les ARN transcrits afin d'identifier les bactéries métaboliquement actives dans l'écosystème ;
- Étudier les voies métaboliques impliquées dans le procédé de fermentation en identifiant les gènes des espèces des BL dominantes impliqués dans la fermentation. L'expression de ces gènes pourrait être aussi étudiée par le biais de méthodes comme la RT-PCR (Reverse-transcription-PCR).
- Analyser la matrice par les nouvelles approches omiques (métabolomique, protéomiques), à fin de caractériser sa fonctionnalité par l'identification des molécules bioactifs comme les peptides et autres.
- Étudier les propriétés biotechnologiques des souches isolées, telles que les propriétés antibactériennes, antifongiques, aromatisantes, et probiotiques.

La combinaison de toutes ces analyses devraient contribuer à la sélection de starters spécifiques dans le but de produire *lemzeiet*, à plus grande échelle, avec une meilleure qualité et de façon contrôlée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

AACC International. Approved Methods of Analysis, 11th Ed. Method 02-31.01. Titratable acidity. Approved November 3, 1999. AACC International, St. Paul, MN, U.S.A.

AACC International. Approved Methods of Analysis, 11th Ed. Method 08-12.01. Ash in Farina and Semolina. Approved April 13, 1961. AACC International, St. Paul, MN, U.S.A.

ABRIOUEL, H., N.B. OMAR, R.L. LÓPEZ, M. MARTÍNEZ-CAÑAMERO, S. KELEKE and A. GÁLVEZ. 2006. Culture-independent analysis of the microbial composition of the African traditional fermented foods *poto poto* and *dégué* by using three different DNA extraction methods. *International Journal of Food Microbiology* 111: 228–233.

ADEBOLU, T.T., A.O. OLODUN and B.C. IHUNWEZE. 2007. Evaluation of *ogi* liquor from different grains for antibacterial activities against some common diarrhoeal bacteria in Southwest Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 6: 1140–1143.

AIKEN, J.T. 2011. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism for Soil Microbial Community Fingerprinting. *Soil Science Society of America Journal* 75: 102.

AMPE, F., N. BEN OMAR, C. MOIZAN, C. WACHER and J.P. GUYOT. 1999. Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, Demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods To Investigate Traditional Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5464–5473.

AOMATSU, T., H. IMAEDA, T. FUJIMOTO, K. TAKAHASHI, A. YODEN, H. TAMAI, ET AL. 2012. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the gut microbiota profiles of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Digestion* 86: 129–135.

ARDÖ, Y. 2006. Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances* 24: 238–242.

AXELSSON, L. 2005. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In *Lactic acid bacteria, Microbiological and Functional Aspects Third Edition, Revised and Expanded*. Marcel Dekker, New York.

B

BARTALI, E.H. 1987. Underground storage pits in morocco. *Tunnelling and Underground Space Technology* 2: 381–383.

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

BELTON, P.S. and J.R.N. TAYLOR . 2002. *Pseudocereals and Less Common Cereals*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

BIANCHINI, A. 2015. Lactic acid bacteria as antifungal agents. In *Advances in Fermented Foods and Beverages* (W. Holzapfel, ed.), pp. 333–353. Woodhead Publishing.

BLANDINO, A., M.E. AL-ASEERI, S.S. PANDIELLA, D. CANTERO and C. WEBB. 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* 36: 527–543.

BOKULICH, N.A., C.F. HWANG, S. LIU, K.L. BOUNDY-MILLS and D.A. MILLS. 2012. Profiling the Yeast Communities of Wine Fermentations Using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *American Journal of Enology and Viticulture* 63: 185–194.

BOKULICH, N.A. and D.A. MILLS. 2012. Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations. *BMB reports* 45: 377–389.

BOTTA, C. and L. COCOLIN. 2012. Microbial dynamics and biodiversity in table olive fermentation: culture-dependent and -independent approaches. *Frontiers in Microbiology* 3.

BOTTON, B. 1990. *Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.* Masson, Paris.

BRANDT, M.J. 2015. Quality improvement and fermentation control in dough fermentations. In *Advances in fermented foods and beverages: improving quality, technologies and health benefits* 1st edition. Woodhead Publishing, Boston, MA.

C

CHAO, S.H., H.Y. HUANG, C.H. CHANG, C.H. YANG, W.S. CHENG, Y.H. KANG, ET AL. 2013. Microbial Diversity Analysis of Fermented Mung Beans (Lu-Doh-Huang) by Using Pyrosequencing and Culture Methods. *PLoS ONE* 8: e63816.

CHAVAN, R.S. and S.R. CHAVAN. 2011. Sourdough Technology—A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10: 169–182.

CIBIK, R., E. LEPAGE and P. TALLIEZ. 2000. Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional french cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification. *Systematic and applied microbiology* 23: 267–278.

COCOLIN, L. and D. ERCOLINI. 2008. *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods.* Springer, New York.

COLLINS, Y.F., P.L.H. MCSWEENEY and M.G. WILKINSON. 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* 13: 841–866.

CORRY, J.E., G.D. CURTIS and R.M. BAIRD. 2011. *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology* First. Royal Society of Chemistry.

CORSETTI, A., G. PERPETUINI and R. TOFALO. 2015. Biopreservation effects in fermented foods. In *Advances in Fermented Foods and Beverages* (W. Holzapfel, ed.), pp. 311–332. Woodhead Publishing.

CROWLEY, S., J. MAHONY and D. VAN SINDEREN. 2013. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science & Technology* 33: 93–109.

CULLEN, P.J. and G.F. SPRAGUE. 2012. The Regulation of Filamentous Growth in Yeast. *Genetics* 190: 23–49.

CZERNY, M. and P. SCHIEBERLE. 2002. Important Aroma Compounds in Freshly Ground Wholemeal and White Wheat Flour Identification and Quantitative Changes during Sourdough Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6835–6840.

D

DALIÉ, D.K.D., A.M. DESCHAMPS and F. RICHARD-FORGET. 2010. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* 21: 370–380.

DAVIES, M.G. and A.J. THOMAS. 1973. An investigation of hydrolytic techniques for the amino acid analysis of foodstuffs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 24: 1525–1540.

DE ROISSART, H. and F.M. LUQUET. 1994. *Metabolisme general des bacteries lactiques. In Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques. Loriga.*

DE VUYST, L., S. VAN KERREBROECK, H. HARTH, G. HUYS, H.M. DANIEL and S. WECKX. 2014. Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiology* 37: 11–29.

DORĐEVIĆ, T.M., S.S. ŠILER-MARINKOVIĆ and S.I. DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ. 2010. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry* 119: 957–963.

E

EKINCI, R. 2005. The effect of fermentation and drying on the water-soluble vitamin content of tarhana, a traditional Turkish cereal food. *Food Chemistry* 90: 127–132.

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

ERCOLINI, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56: 297–314.

ERCOLINI, D., G. MOSCHETTI, G. BLAIOTTA and S. COPPOLA. 2001. The potential of a polyphasic PCR-dGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Systematic and Applied Microbiology* 24: 610–617.

F

FALENTIN, H., N. HENAFF, P. LE BIVIC, S.-M. DEUTSCH, S. PARAYRE, R. RICHOUX, ET AL. 2012. Reverse transcription quantitative PCR revealed persistency of thermophilic lactic acid bacteria metabolic activity until the end of the ripening of Emmental cheese. *Food Microbiology* 29: 132–140.

FAO [online]. 2014. Crop Prospects and Food Situation. No 4, December. <<http://www.fao.org/GIEWS/ENGLISH/cpfs/I4256e/I4256E.html>>.

FLEET, G.H. 1997. The microbiology of alcoholic beverages. In *Microbiology of Fermented Foods* (B.J.B. Wood, ed.), pp. 217–262. Springer US.

FOSTER, M.S. and G.F. BILLS. 2004. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Academic Press.

FRAHER, M.H., P.W. O'TOOLE and E.M.M. QUIGLEY. 2012. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 9: 312–322.

FUKA, M.M., S. WALLISCH, M. ENGEL, G. WELZL, J. HAVRANEK and M. SCHLOTER. 2013. Dynamics of Bacterial Communities during the Ripening Process of Different Croatian Cheese Types Derived from Raw Ewe's Milk Cheeses. *PLoS ONE* 8: e80734.

G

GANI, A., W. SM and M. FA. 2012. Whole-Grain Cereal Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. *Journal of Food Processing & Technology* 03.

GÄNZLE, M. and R. FOLLADOR. 2012. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. *Food Microbiology* 3: 340.

GÄNZLE, M.G. 2014. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology* 37: 2–10.

GÄNZLE, M.G., N. VERMEULEN and R.F. VOGEL. 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology* 24: 128–138.

GIRAFFA, G. and D. CARMINATI. 2008. *Molecular Techniques in Food Fermentation: Principles and Applications*. In *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods* p. 280. Springer, New York.

GIRAFFA, G. and E. NEVIANI. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 67: 19–34.

GIRAFFA, G. 2014. Overview of the ecology and biodiversity of the LAB. In *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*.

GOBBETTI, M., C.G. RIZZELLO, R. DI CAGNO and M. DE ANGELIS. 2013. How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. *Food Microbiology* 37: 30–40.

GODON, J.J., E. ZUMSTEIN, P. DABERT, F. HABOUZIT and R. MOLETTA. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2802–2813.

GOSIEWSKI, T., A. CHMIELARCZYK, M. STRUS, M. BRZYCHCZY-WOCH and P. HECZKO. 2012. The application of genetics methods to differentiation of three *Lactobacillus* species of human origin. *Annals of Microbiology* 62: 1437–1445.

GUARRO, J., J. GENÉ and A.M. STCHIGEL. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 454–500.

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

Guyot, J.P. 2012. Cereal-based fermented foods in developing countries: ancient foods for modern research. *International Journal of Food Science & Technology* 47: 1109–1114.

H

HAAS, G.J., H.E. PRESCOTT, E. DUDLEY, R. DIK, C. HINTLIAN and L. KEANE. 1989. Inactivation of Microorganisms by Carbon Dioxide Under Pressure. *Journal of Food Safety* 9: 253–265.

HAMAD, S. H., M. C. DIENG, M. A. EHRMANN and R. F. VOGEL. 1997. Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *Journal of Applied Microbiology* 83: 764–770.

HAMMES, W.P., M.J. BRANDT, K.L. FRANCIS, J. ROSENHEIM, M.F.H. SEITTER and S.A. VOGELMANN. 2005. Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science & Technology* 16: 4–11.

HERVE, A., G. COSETTE, G.B. MICHELE, R.B. FABIENNE and T.M. RAPHAËLLE. 2008. Identification et dénombrement des bactéries lactiques dans le vin. In *Les bactéries lactiques en œnologie*. Lavoisier.

HOLLAND, R., S.Q. LIU, V.L. CROW, M.L. DELABRE, M. LUBBERS, M. BENNETT and G. NORRIS. 2005. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal* 15: 711–718.

HUMBLLOT, C. and J.P. GUYOT. 2008. Other Fermentations. In *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods* p. 280. Springer, New York.

HUMBLLOT, C. and J.P. GUYOT. 2009. Pyrosequencing of Tagged 16S rRNA Gene Amplicons for Rapid Deciphering of the Microbiomes of Fermented Foods Such as Pearl Millet Slurries. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 4354–4361.

I

ISO 712. 2009. Céréales et produits céréaliers. Détermination de la teneur en eau.

ISO 1871. 2009. Produits alimentaires et aliments des animaux. Lignes directrices générales pour le dosage de l'azote selon la méthode de Kjeldahl.

ISO 7302. 1982. Céréales et produits céréaliers. Détermination de la teneur en matières grasses totales.

ISO 7305. 1998. Produits de mouture des céréales. Détermination de l'acidité grasse.

IWANSKI, R.Z., M. WIANECKI, I. DMYTROW and K. KRYZA. 2012. Effect of Fermentation Reactions on Rheological Properties of Foods. In *Fermentation: Effects on Food Properties*. CRC Press.

J

JANECZKO, A., J. BIESAGA-KOŚCIELNIAK, J. OKLEŠT'KOVÁ, M. FILEK, M. DZIURKA, G. SZAREK-ŁUKASZEWSKA and J. KOŚCIELNIAK. 2010. Role of 24-Epibrassinolide in Wheat Production: Physiological Effects and Uptake. *Journal of Agronomy and Crop Science*.

JESPERSEN, L. 2003. Occurrence and taxonomic characteristics of strains of predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEMS Yeast Research* 3: 191–200.

JONES, R.P. and P.F. GREENFIELD. 1982. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 4: 210–223.

JUILLARD, V., D. LE BARS, E.R. KUNJI, W.N. KONINGS, J.C. GRIPON and J. RICHARD. 1995. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3024–3030.

K

KAKSONEN, A. [online]. 2014. Molecular approaches for microbial community analysis. <http://wiki.biomine.skelleftea.se/biomine/molecular/index_02.htm>.

KAMAL-ELDIN, A. 2012a. The Role of Fermentation in Providing Biologically Active Compounds for the Human Organism. In *Fermentation: Effects on Food Properties*. CRC Press.

KAMAL-ELDIN, A. 2012b. Fermented Cereal and Legume Products. In *Fermentation: Effects on Food Properties*. CRC Press.

KERKHOF, L., M. SANTORO and J. GARLAND. 2000. Response of soybean rhizosphere communities to human hygiene water addition as determined by community level physiological profiling (CLPP) and terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis. *FEMS microbiology letters* 184: 95–101.

KEZIH, R., F. BEKHOUCHE and A. MERAZKA. 2014. Some traditional Algerian products from durum wheat. *African Journal of Food Science* 8: 30–34.

KOFI, E.A. and A.J.R. NOUT. 2010. Functional Yeasts and Molds in Fermented Foods and Beverages. In *Fermented foods and beverages of the world*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton.

L

LEI, V. and M. JAKOBSEN. 2004. Microbiological characterization and probiotic potential of koko and koko sour water, African spontaneously fermented millet porridge and drink. *Journal of Applied Microbiology* 96: 384–397.

LICITRA, G., J.C. OGIER, S. PARAYRE, C. PEDILIGGIERI, T.M. CARNEMOLLA, H. FALENTIN, ET AL. 2007. Variability of Bacterial Biofilms of the “Tina” Wood Vats Used in the Ragusano Cheese-Making Process. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6980–6987.

LIU, W.T., T.L. MARSH, H. CHENG and L.J. FORNEY. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4516–4522.

LORTAL, S., A. ROUAULT, S. GUEZENEC and M. GAUTIER. 1997. *Lactobacillus helveticus*: strain typing and genome size estimation by pulsed field gel electrophoresis. *Current Microbiology* 34: 180–185.

M

MACE, S. 2013. Thèse : Caractérisation et quantification moléculaires de l'écosystème microbien d'altération du saumon cru et des crevettes cuites. Université Nantes Angers Le Mans (France).

MADOROBA, E., E.T. STEENKAMP, J. THERON, I. SCHEIRLINCK, T.E. CLOETE and G. HUYS. 2011. Diversity and dynamics of bacterial populations during spontaneous sorghum fermentations used to produce ting, a South African food. *Systematic and Applied Microbiology* 34: 227–234.

MALLIA, S., F. ESCHER and H. SCHLICHTERLE-CERNY. 2008. Aroma-active compounds of butter: a review. *European Food Research and Technology* 226: 315–325.

MANDAL, V., S.K. SEN and N.C. MANDAL. 2013. Production and partial characterisation of an inducer-dependent novel antifungal compound(s) by *Pediococcus acidilactici* LAB 5. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 2445–2453.

MAOURA, N., M. MBAIGUINAM, H.V. NGUYEN, C. GAILLARDIN and J. POURQUIE. 2005. Identification and typing of the yeast strains isolated from bili bili, a traditional sorghum beer of Chad. *African Journal of Biotechnology* 4: 646–656.

MEDINA, R.B., M.B. KATZ, S. GONZÁLEZ and G. OLIVER. 2004. Determination of Esterolytic and Lipolytic Activities of Lactic Acid Bacteria. In *Public Health Microbiology* pp. 465–470. Humana Press, New Jersey.

MEHTA, B.M., A. KAMAL-ELDIN and R.Z. IWANSKI. 2012. *Fermentation: Effects on Food Properties*. CRC Press.

MEROTH, C.B., W.P. HAMMES and C. HERTEL. 2004. Characterisation of the Microbiota of Rice Sourdoughs and Description of *Lactobacillus spicheri* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 151–159.

M'HIR, S., F. MINERVINI, R. DI CAGNO, N. CHAMMEM and M. HAMDI. 2012. Technological, functional and safety aspects of enterococci in fermented vegetable products: a mini-review. *Annals of Microbiology* 62: 469–481.

MOKHTARI, S. 2012. Mémoire de Magister : Effet protecteur de certaines bactéries lactiques isolées à partir de blé fermenté type hamoum. Université El Senia (Oran, Algérie).

MOROT-GAUDRY, J.F., F. MOREAU, R. PRAT and C. MAUREL. 2012. *Biologie végétale : Nutrition et métabolisme* Tome 12ème édition.

MOTARJEMI, Y. 2002. Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* 75: 213–229.

MUGULA, J.K., S.A.M. NNKO, J.A. NARVHUS and T. SØRHAUG. 2003. Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *International Journal of Food Microbiology* 80: 187–199.

MUGULA, J. K., S. A. M. NNKO and T. SØRHAUG. 2001. Changes in Quality Attributes During Storage of Togwa, a Lactic Acid Fermented Gruel. *Journal of Food Safety* 21: 181–194.

MUYANJA, C.M.B.K., J.A. NARVHUS, J. TREIMO and T. LANGSRUD. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International journal of food microbiology* 80: 201–210.

MUYZER, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2: 317–322.

N

NAKAI, H., M.J. BAUMANN, B.O. PETERSEN, Y. WESTPHAL, H. SCHOLS, A. DILOKPIMOL, ET AL. 2009. The maltodextrin transport system and metabolism in *Lactobacillus acidophilus* NCFM and production of novel alpha-glucosides through reverse phosphorylation by maltose phosphorylase. *The FEBS journal* 276: 7353–7365.

NALBANTOGLU, U., A. CAKAR, H. DOGAN, N. ABACI, D. USTEK, K. SAYOOD and H. CAN. 2014. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. *Food Microbiology* 41: 42–51.

NAM, Y.D., S.H. YI and S.I. LIM. 2012. Bacterial diversity of cheonggukjang, a traditional Korean fermented food, analyzed by barcoded pyrosequencing. *Food Control* 28: 135–142.

NASER, S.M., P. DAWYNDT, B. HOSTE, D. GEVERS, K. VANDEMEULEBROECKE, I. CLEENWERCK, ET AL. 2007. Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2777–2789.

NDOYE, B., E.A. RASOLOFO, G. LAPOINTE and D. ROY. 2011. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science & Technology* 91: 495–524.

NF V 18-301, 1983. *Aliments des animaux. Dénombrement des moisissures*. Assoc. Fr. Normalisation, Paris.

NOUT, M.J.R. 2009. Rich nutrition from the poorest – Cereal fermentations in Africa and Asia. *Food Microbiology* 26: 685–692.

O

OGIER, J.C., O. SON, A. GRUSS, P. TAILLIEZ and A. DELACROIX-BUCHET. 2002. Identification of the Bacterial Microflora in Dairy Products by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3691–3701.

OGUNTOYINBO, F.A. and A. NARBAD. 2012. Molecular characterization of lactic acid bacteria and in situ amylase expression during traditional fermentation of cereal foods. *Food Microbiology* 31: 254–262.

OLIVEIRA, P.M., E. ZANNINI and E.K. ARENDT. 2014. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. *Food Microbiology* 37: 78–95.

BEN OMAR, N. and F. AMPE. 2000. Microbial Community Dynamics during Production of the Mexican Fermented Maize Dough Pozol. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3664–3673.

OUWEHAND, A.C. and H. RÖYTIÖ. 2015. Probiotic fermented foods and health promotion. In *Advances in Fermented Foods and Beverages* (W. Holzapfel, ed.), pp. 39–74. Woodhead Publishing.

P

PARAYRE, S., H. FALENTIN, M.N. MADEC, K. SIVIERI, A.S. LE DIZES, D. SOHIER and S. LORTAL. 2007. Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. *Journal of Microbiological Methods* 69: 431–441.

PETRI, A., J. PFANNEBECKER, J. FRÖHLICH and H. KÖNIG. 2013. Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiology* 33: 48–54.

POGAČIĆ, T., M.B. MAILLARD, A. LECLERC, C. HERVÉ, V. CHUAT, A.L. YEE, ET AL. 2015. A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiology* 46: 145–153.

POGAČIĆ, T., A. MANCINI, M. SANTARELLI, B. BOTTARI, C. LAZZI, E. NEVIANI and M. GATTI. 2013. Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard cheese produced from raw milk and undefined natural starter. *Food Microbiology* 36: 207–215.

R

RADEMAKER, J.L.W., J.D. HOOLWERF, A.A. WAGENDORP and M.C. TE GIFFEL. 2006. Assessment of microbial population dynamics during yoghurt and hard cheese fermentation and ripening by DNA population fingerprinting. *International Dairy Journal* 16: 457–466.

RADEMAKER, J.L.W., M. PEINHOPF, L. RIJNEN, W. BOCKELMANN and W.H. NOORDMAN. 2005. The surface microflora dynamics of bacterial smear-ripened Tilsit cheese determined by T-RFLP DNA population fingerprint analysis. *International Dairy Journal* 15: 785–794.

RASTOIN, J.L. and E.H. BENABDERRAZIK. 2014. Céréales et oléoprotéagineux au Maghreb : Pour un co-développement de filières territorialisées. Collection Construire la Méditerranée. IPEMED.

RIZZELLO, C.G., A. CASSONE, R. DI CAGNO and M. GOBBETTI. 2008. Synthesis of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides and γ -Aminobutyric Acid (GABA) during Sourdough Fermentation by Selected Lactic Acid Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6936–6943.

RIZZELLO, C.G., R. CODA, F. MAZZACANE, D. MINERVINI and M. GOBBETTI. 2012. Micronized by-products from debranned durum wheat and sourdough fermentation enhanced the nutritional, textural and sensory features of bread. *Food Research International* 46: 304–313.

RIZZELLO, C., L. NIONELLI, R. CODA, R. DI CAGNO and M. GOBBETTI. 2010. Use of sourdough fermented wheat germ for enhancing the nutritional, texture and sensory characteristics of the white bread. *European Food Research and Technology* 230: 645–654.

S

SÁNCHEZ, I., S. SESEÑA and L. L. PALOP. 2004. Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with “Almagro” eggplants spontaneous fermentation, based on combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis patterns. *Journal of Applied Microbiology* 97: 446–458.

SÁNCHEZ, J.I., L. ROSSETTI, B. MARTÍNEZ, A. RODRÍGUEZ and G. GIRAFFA. 2006. Application of reverse transcriptase PCR-based T-RFLP to perform semi-quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. *Journal of Microbiological Methods* 65: 268–277.

SANNI, A.I., J. MORLON-GUYOT and J.P. GUYOT. 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *International Journal of Food Microbiology* 72: 53–62.

SAULNIER, L. 2012. Les grains de céréales : diversité et compositions nutritionnelles. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 47: S4–S15.

SCHILLINGER, U. and W. HOLZAPFEL. 2011. Culture Media for Lactic Acid Bacteria. In *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology* Third. Royal Society of Chemistry.

SCHÜTTE, U.M.E., Z. ABDO, S.J. BENT, C. SHYU, C.J. WILLIAMS, J.D. PIERSON and L.J. FORNEY. 2008. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80: 365–380.

SEKWATI-MONANG, B., R. VALCHEVA and M.G. GÄNZLE. 2012. Microbial ecology of sorghum sourdoughs: Effect of substrate supply and phenolic compounds on composition of fermentation microbiota. *International Journal of Food Microbiology* 159: 240–246.

SMID, E.J. and M. KLEEREBEZEM. 2014. Production of Aroma Compounds in Lactic Fermentations. *Annual Review of Food Science and Technology* 5: 313–326.

SMITH, C.A., E.J. WANT, G. O'MAILLE, R. ABAGYAN and G. SIUZDAK. 2006. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry* 78: 779–787.

SMITH, C.L. and C.R. CANTOR. 1987. Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. In *Methods in Enzymology* (Ray Wu, ed.), pp. 449–467. Academic Press.

SONGRÉ-OUATTARA, L.T., C. MOUQUET-RIVIER, C. ICARD-VERNIÈRE, C. HUMBLLOT, B. DIAWARA and J.P. GUYOT. 2008. Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (ben-saalga) of functional interest in nutrition. *International Journal of Food Microbiology* 128: 395–400.

SPACKMAN, D.H., W.H. STEIN and S. MOORE. 1958. Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids. *Analytical Chemistry* 30: 1190–1206.

T

TAMANG, J.P. 2010a. Diversity of Fermented Foods. In *Fermented foods and beverages of the world* p. 448. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, USA.

TAMANG, J.P. 2010b. Himalayan fermented foods: microbiology, nutrition, and ethnic values. CRC Press, Boca Raton.

TAMANG, J. P. 2010c. Diversity of fermented beverages and alcoholic drinks. In *Fermented foods and beverages of the world* p. 448. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, USA.

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

TAMANG, J.P. 2010e. Fermented milks. In *Himalayan fermented foods: microbiology, nutrition, and ethnic values*. CRC Press, Boca Raton.

TAMANG, J.P. 2010f. Fermented cereals. In *Himalayan fermented foods: microbiology, nutrition, and ethnic values*. CRC Press, Boca Raton.

TAMANG, J.P. and G.H. FLEET. 2009. Yeasts Diversity in Fermented Foods and Beverages. In *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (T. Satyanarayana & G. Kunze, eds.), pp. 169–198. Springer Netherlands.

TODOROV, S.D. and B.D.G. DE M. FRANCO. 2010. *Lactobacillus plantarum*: characterization of the species and application in food production. *Food Reviews International* 26: 205–229.

TODOROV, S.D. and W.H. HOLZAPFEL. 2015. Traditional cereal fermented foods as sources of functional microorganisms. In *Advances in Fermented Foods and Beverages* (W. Holzapfel, ed.), pp. 123–153. Woodhead Publishing.

TOU, E.H., J.P. GUYOT, C. MOUQUET-RIVIER, I. ROCHETTE, E. COUNIL, A.S. TRAORÉ and S. TRÈCHE. 2006. Study through surveys and fermentation kinetics of the traditional processing of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) into ben-saalga, a fermented gruel from Burkina Faso. *International Journal of Food Microbiology* 106: 52–60.

TOU, E.H., C. MOUQUET-RIVIER, I. ROCHETTE, A.S. TRAORÉ, S. TRÈCHE and J.P. GUYOT. 2007. Effect of different process combinations on the fermentation kinetics, microflora and energy density of ben-saalga, a fermented gruel from Burkina Faso. *Food Chemistry* 100: 935–943.

V

VANDAMME, P., K. DE BRUYNE and B. POT. 2014. Phylogenetics and systematics. In *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*.

VAN BOEKEL, M.A.J.S. 2006. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances* 24: 230–233.

VASUDHA, S. and H.N. MISHRA. 2012. Non dairy probiotic beverages. *Int Food Res J* 20: 7–15.

VERNILE, A., G. GIAMMANCO, G. SPANO, T.P. BERESFORD, P.F. FOX and S. MASSA. 2008. Genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional Pecorino Siciliano cheese. *Dairy Science & Technology* 88: 619–629.

VOGEL, R.F., R. KNORR, M.R. MÜLLER, U. STEUDEL, M.G. GÄNZLE and M.A. EHRMANN. 1999. Non-dairy lactic fermentations: the cereal world. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 403–411.

VRANCKEN, G., T. RIMAU, S. WECKX, F. LEROY and L.D. VUYST. 2011. Influence of Temperature and Backslopping Time on the Microbiota of a Type I Propagated Laboratory Wheat Sourdough Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 2716–2726.

VRANCKEN, G., T. RIMAU, S. WECKX, L. DE VUYST and F. LEROY. 2009. Environmental pH determines citrulline and ornithine release through the arginine deiminase pathway in *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101. *International journal of food microbiology* 135: 216–222.

W

WU, J.J., Y.K. MA, F.F. ZHANG and F.S. CHEN. 2012. Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of “Shanxi aged vinegar”, a traditional Chinese vinegar. *Food Microbiology* 30: 289–297.

Y

YOUSIF, N.M.K., M. HUCH, T. SCHUSTER, G.-S. CHO, H.A. DIRAR, W.H. HOLZAPFEL and C.M.A.P. FRANZ. 2010. Diversity of lactic acid bacteria from Hussuwa, a traditional African fermented sorghum food. *Food Microbiology* 27: 757–768.

YVON, M. and L. RIJNEN. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* 11: 185–201.

Z

ZACHAROF, M.P. and R.W. LOVITT. 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia* 2: 50–56.

ANNEXES

Annexe 1 : Questionnaire

Questionnaire sur les conditions de fermentation du blé dans les fûts

Questionnaire n° Date :

Adresse complète du fabricant :

Lieu de l'enquête :

Situation professionnelle :

Age :

Sexe : femme homme

1- Matière première et matériel utilisé dans la fermentation

- Quelle est la nature du blé utilisé ? dur tendre
- Comment est utilisé le blé pour la fermentation ?
tel qu'il est après récolte (à préciser) après nettoyage à sec après nettoyage à l'eau
- l'eau utilisée : eau du robinet autre.....
- L'eau est elle bouillie ? oui non
- L'eau ajoutée, est-elle : chaude froide tiède
- Y a-t-il un (des) additif (s) ajouté (s) au blé ? oui non
- Si oui préciser :
- Quantité et proportion de l'additif
- Matériels utilisés pour la fermentation du blé : fûts bidons autre
- Capacité du matériel utilisé :
- La nature du matériel utilisé :
 métal plastique autre

2- Procédé et paramètres physicochimique qui conditionnent la fermentation

- Quelle est la proportion du blé par rapport au volume total du milieu ? 1/3 1/2 2/3 autre.....
- Quel est l'état du blé durant la fermentation ? immergé dans l'eau légèrement humidifié sec
- Dans le cas où le blé serait immergé, quel est le niveau de l'eau qui dépasse celui du blé ?
 - entre 1 et 5 cm
 - entre 5 et 10 cm
 - autre
- Dans le cas où un additif serait ajouté, préciser à quel moment de la fermentation ?
- Le matériel utilisé est-il fermé ? oui non
- Si oui, la fermeture est-elle étanche ? oui non
- préciser le moyen de fermeture :
- Pendant combien de temps le blé est-il fermenté ?
- Le blé est-il entreposé dans un endroit : chaud tiède frais peu froid froid
- La température du local dépend-elle de la saison ? oui non
- Si non préciser :
- La température du local est-elle constante pendant toute la durée de la fermentation ? oui non
- Si non, préciser :
- Au cours de la fermentation, le blé subit-il une agitation ou un remuement ? oui non
- Si oui, préciser à quel moment et par quel moyen ?



Sélection
de la céréale

Questionnaire sur les conditions de fermentation du blé dans les fûts

3- Caractéristiques et traitements du blé après la fermentation

- Le grain obtenu est-il fragmenté : oui non
- Quelles sont les caractéristiques du blé ?
 - texture : ferme molle aplati
 - aspect : brillant mat
 - gout : acide aigre doux
 - couleur : jaune rouge marron brun
 - odeur :
 - taille et volume : augmentation diminution stabilité
- reste-t-il encore de l'eau : oui non
- si oui, à quelles proportions :
- comment le blé est-il récupéré : à l'état humide après filtration du milieu
- comment le blé est-il séché : à l'air libre sinon comment :
- le broyage du blé est réalisé comment :
- quels sont les produits obtenus ?
 - semoule de blé fermenté son de blé fermenté autre.....
- quel est le produit final :
 - couscous de blé fermenté autre.....

Annexe 2 : PFGE (solutions et tampons)

- **Tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) pH 8,0**

Tris-base 10mM	PM 121,14	2,42 g
EDTA (Titriplex II) 1mM	PM 292,25	0,58 g
Eau distillée	qsp	2 litres

pH initial environ 8,3 ajusté à 8,0 avec HCl 1N. Autoclaver 20 min à 115°C.

- **Tampon TES (TE + Saccharose)**

Saccharose 0,5M	PM 342,3	85,57g
Tampon TE	qsp	500 ml

Autoclaver 20 min à 115°C.

- **Solution d'EDTA (125 mM, pH 7,0)**

EDTA 125 mM	PM 292,25	18,26 g
-------------	-----------	---------

Ajouter 450 ml d'eau distillée (pH 3,0), ajuster le pH à 7,0 avec le NaOH 5N.
Eau distillée qsp 500 ml
Autoclaver 20 min à 115°C.

- **Tampon pour protéinase K (Tris : 10 mM ; EDTA :100 mM ; pH : 8,0)**

Tris-base 10 mM	PM 121,14	0,6 g
EDTA 100 mM	PM 292,25	14,6 g

Ajouter 450 ml d'eau distillée, ajuster le pH à 8,0 avec le NaOH 5N
Eau distillée qsp 500 ml
Autoclaver 20 min à 115°C.

- **Solution SDS à 10%**

SDS	10 g
Eau distillée qsp	100 ml

Ne pas autoclaver

- **Solution stock de protéinase K à 20 mg/ml (à préparer stérilement, dater et congeler)**

Protéinase K	500 mg
Eau distillée stérile	25 ml

Répartir 1 ml en Eppendorf stérile étiqueté individuellement. Congeler les Eppendorf.

- **Solution de déprotéinisation (Tris-base : 10 mM ; EDTA: 100 mM ; pH : 8,0 ; SDS : 1% ; Protéinase K : 50µg/ml) à préparer extemporanément.**

Pour 10 souches :

Tampon pour protéinase K	6600 µl
Solution SDS à 10%	660 µl
protéinase K (Qiagen) à 20 mg/ml	110 µl

- **Tampon de migration TBE : TRIS-BORATE-EDTA**

Utiliser le tampon Tris-Borate-EDTA buffer 10x Sigma T 4415 ou le préparer selon la formule suivante:

TBE 10x : Solution stock

Tris-base 0,89M	PM 121,14	108 g
Acide borique 0,89M	PM 61,83	55 g
EDTA 0,02M	PM 292,25	5,8 g
Eau distillée	qsp	1litre
pH environ 8,3		
Autoclaver 20 min à 115°C.		

TBE 0,5x

Diluer 20 fois la solution 10x dans l'eau osmosée à pH compris entre 6,5 et 7,0 (pour 100 ml compléter à 2 litres).

Annexe 3 : TTGE (gels et tampons)

- **Tampon de migration**

Mettre 7 litres de tampon Tris, Acétate, EDTA (TAE) 1,25x dans la cuve ;
 Tampon TAE 50x 175 ml
 Eau distillée : 6825 ml

Préparation de la cuve d'électrophorèse

Préchauffer le tampon TAE à 63°C , environ 2 h avec gradient de 200°C/heure

- **Gel à 10% polyacrylamide (Urée 7M)**

Pour 1 gel : préparer 25 ml dans un flacon de 40 ml :

40% acrylamide/bis (37,5 :1)	6,25 ml
TAE 50x	0,625 ml
Urée	10,5 g
Temed	25 µl
Persulfate d'ammonium à 10% (90 mg+ 900 µl d'eau)	250 µl
Eau distillée	10,25 ml

Le gel peut être préparé à l'avance (ajouter le Temed et le persulfate extemporanément) :

- Couler 21 ml de gel ;
- Déposer doucement environ 1 à 2 ml d'eau sur le gel ;
- Polymérisation en 20 à 30 min ;

- **Stacking gel sans urée**

Pour 2 gels : préparation de 7 ml

40% acrylamide/bis (37,5 :1)	2,1 ml
TAE 50x	175 µl
Temed	7 µl
Persulfate d'ammonium à 10%	70 µl
Eau distillée	4,65 ml

- **Tampon de charge**

bromophenol blue à 2%	0,25 ml
xylene cyanol à 2%	0,25 ml
glycerol à 100%	7 ml
Eau distillée	2,5 ml
Volume total	10 ml

- **Préparation des échantillons**

- Ajouter 10µl de tampon de charge directement dans les tubes PCR contenant environ 50µl d'amplicon.
- Charger 10 à 25 µl.

- **Préparation du marqueur**

- Dans un tube de 1,5 ml, ajouter les différents amplicons des souches pures (marqueurs) ci-dessous en respectant les volumes indiqués
- Ajouter 25 µl de tampon de charge
- Volume de marqueur par puits 30µl

- **Marqueurs**

13 µl de :

- Lb. plantarum CNRZ 211
- Lb. fermentum CNRZ 209T
- E. faecium CNRZ 149
- Lb. helveticus CNRZ 223T
- E. faecalis CNRZ 137

15 µl de :

- 6- *Lc. lactis* CNRZ 105
- 7- *S. thermophilus* CIP 102303
- 8- *Coryné moorparkense* CIP 107183T
- 10- *Lb. paracasei* LMG 9192

19 µl de:

- 11- *Arthro. nicotianae* CIP 82.107T
- 12- *Brevi. casei* CIP 102111T
- 13- *Propio. cyclohexanicum* TL1365

Annexe 4 : Séquences du gène *pheS*

>Seq1 [organism=Enterococcus faecium] *E. faecium* 20_pheS

ATGCAAGATACTTTCTATATTTTCAGACGAGATATTGATTTCGGACACATACTTCACCAGTCCAAGCACGGACAATGGAAAAGC
ATGATTTCTCTAAGGGTGCTCTACGAATGATCTCGCCAGGAAAAGTTTTCCGCAGAGATACAGATGATGCGACCCACAGCCAT
CAGTTCATCAAATTGAAGGGCTAGTTGTTGATAAAAAACATCACGATGGGCGACCTTAAAGGAACATTAGAAGTCGTAATGA
AAAAATGTTTGGGGAAGAACGTGAAATCCGTTTGCGTCCAAGTTATTTCCCATTTACGGAGCCATCAGTAGAAGTAGATGTC
AGCTGTTCAAATGTGGTGGTGCCGGTTGTAACGTATGTAATACTG

>Seq2 [organism=Enterococcus faecium] *E. faecium* 25_pheS

CGGATATGCAAGATACTTTCTATATTTTCAGACGAGATATTGATTTCGGACACATACTTCACCAGTCCAAGCACGGACAATGGAA
AAGCATGATTTCTCTAAGGGTGCTCTACGAATGATCTCGCCAGGAAAAGTTTTCCGCAGAGATACAGATGATGCGACCCACA
GCCATCAGTTCATCAAATTGAAGGGCTAGTTGTTGATAAAAAACATCACGATGGGCGACCTTAAAGGAACATTAGAAGTCGT
AATGAAAAAATGTTTGGGGAAGAACGTGAAATCCGTTTGCGTCCAAGTTATTTCCCATTTACGGAGCCATCAGTAGAAGTAG
GATGTCAGCTGTTCAAATGTGGTGGTGCCGGTTGTAACGTATGTAATACTG

>Seq3 [organism=Enterococcus faecium] *E. faecium* 31_pheS

CGGATATGCAAGATACTTTCTATATTTTCAGACGAGATATTGATTTCGGACACATACTTCACCAGTCCAAGCACGGACAATGGAA
AAACATGATTTCTCTAAGGGTGCTCTACGAATGATCTCGCCAGGAAAAGTTTTCCGCAGAGATACAGATGATGCGACCCACA
GTCATCAGTTCATCAAATTGAAGGGCTAGTTGTTGATAAAAAACATCACAATGGGCGACCTTAAAGGAACATTAGAAGTCGT
AATGAAAAAATGTTTGGGGAAGATCGTGAATCCGTTTGCGTCCAAGTTATTTCCCATTTACGGAGCCATCAGTAGAAGTAG
ATGTCAGCTGTTCAAATGTGGTGGTGCCGGTTGTAACGTATGTAATACTG

>Seq4 [organism=Enterococcus faecium] *E. faecium* 65_pheS

CGGATATGCAAGATACTTTCTATATTTTCAGACGAGATATTGATTTCGGACACATACTTCACCAGTCCAAGCACGGACAATGGAA
AAGCATGATTTCTCTAAGGGTGCTCTACGAATGATCTCGCCAGGAAAAGTTTTCCGCAGAGATACAGATGATGCGACCCACA
GCCATCAGTTCATCAAATTGAAGGGCTAGTTGTTGATAAAAAACATCACGATGGGCGACCTTAAAGGAACATTAGAAGTCGT
AATGAAAAAATGTTTGGGGAAGATCGTGAATCCGTTTGCGTCCAAGTTATTTCCCATTTACGGAGCCATCAGTAGAAGTAG
ATGTCAGCTGTTCAAATGTGGTGGTGCCGGTTGTAACGTATGTAATACTG

>Seq5 [organism=Enterococcus faecium] *E. faecium* 66_pheS

CGGATATGCAAGATACTTTCTATATTTTCAGACGAGATATTGATTTCGGACACATACTTCACCAGTCCAAGCACGGACAATGGAA
AAGCATGATTTCTCTAAGGGTGCTCTACGAATGATCTCGCCAGGAAAAGTTTTCCGCAGAGATACAGATGATGCGACCCACA
GCCATCAGTTCATCAAATTGAAGGGCTAGTTGTTGATAAAAAACATCACGATGGGCGACCTTAAAGGAACATTAGAAGTCGT
AATGAAAAAATGTTTGGGGAAGAACGTGAAATCCGTTTGCGTCCAAGTTATTTCCCATTTACGGAGCCATCAGTAGAAGTAG
GATGTCAGCTGTTCAAATGTGGTGGTGCCGGTTGTAACGTATGTAATACTG

>Seq6 [organism=Enterococcus faecium] *E. faecium* 67_pheS

TCATCCGGCCCCGGATATGCAAGATACTTTCTATATTTTCAGACGAGATATTGATTTCGGACACATACTTCACCAGTCCAAGCAC
GGACAATGGAAAAGCATGATTTCTCTAAGGGTGCTCTACGAATGATCTCGCCAGGAAAAGTTTTCCGCAGAGATACAGATGA
TGCGACCCACAGCCATCAGTTCATCAAATTGAAGGGCTAGTTGTTGATAAAAAACATCACGATGGGCGACCTTAAAGGAACA
TTAGAAGTCGTAATGAAAAAATGTTTGGGGAAGAACGTGAAATCCGTTTGCGTCCAAGTTATTTCCCATTTACGGAGCCATC
AGTAGAAGTAGATGTCAGCTGTTCAAATGTGGTGGTGCCGGTTGTAACGTATGTAATACTG

>Seq7 [organism=Enterococcus faecium] *E. faecium* 80_pheS

CGGATATGCAAGATACTTTCTATATTTTCAGACGAGATATTGATTTCGGACACATACTTCACCAGTCCAAGCACGGACAATGGAA
AAGCATGATTTCTCTAAGGGTGCTCTACGAATGATTTCGCCAGGAAAAGTTTTCCGCAGAGATACAGATGATGCGACCCACA
GCCATCAGTTCATCAAATTGAAGGGCTAGTTGTTGATAAAAAACATCACGATGGGCGACCTTAAAGGAACATTAGAAGTCGT
AATGAAAAAATGTTTGGGGAAGAACGTGAAATCCGTTTGCGCCCAAGTTATTTCCCATTTACGGAGCCATCAGTAGAAGTAG
GATGTCAGCTGTTCAAATGTGGTGGTGCCGGTTGTAACGTATGTAATACTG

>Seq8 [organism=Enterococcus faecium] *E. faecium* 101_pheS

CGGATATGCAAGATACTTTCTATATTTTCAGACGAGATATTGATTTCGGACACATACTTCACCAGTCCAAGCTCGAACAATGGAA
AAACATGACTTTTCAAAGGGACCATTAATAATGATCTCACCCAGGGTAGTTTACCGTCGAGATACTGATGATGCTACTCATT
CACACCAATTCATCAAATTGAAGGATTAGTGATTGATAAAGAACATTACGATGGGTGATTTGAAAGGAACCTTAGTAACCTTTG

GCTAAGGAACTTTTGGGGATCGTTTTGAAGTACGCTTGCCTCAAGTTATTTCCATTTACGGAACCTTCTGTGAAGCAGAG
GTTACTTGCTTAATTGTATGGAAAAAGGCTGTTTCAGTATGTAAGTCAACCGGTTGGATAGAATTTTAGGGGCGGGGTG

>Seq9 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 191_pheS

CCGATATGTAAGATACTTCTATATTTTCAGACGAGATATTGATTCGGACACATACTTACCAGTCCAAGCACGGACAATGGAA
AAGCATGATTTCTCTAAGGGTGTCTACGAATGATCTGCCAGGAAAAGTTTTCCGCAGAGATACAGATGATGCGACCCACA
GCCATCAGTTCATCAAATTGAAGGGCTAGTTGTTGATAAAAAACATCACGATGGGCGACCTTAAAGGAACATTAGAAGTCGT
AATGAAAAAATGTTTGGGGAAGAACGTGAAATCCGTTTGCCTCAAGTTATTTCCATTTACGGAGCCATCAGTAGAAGTA
GATGTCAGCTGTTTCAAATGTGGTGGTGCCGGTTGTAACGTATGTAATACACTGGCTGGATCGAGATTTTAGGAGCCG

>Seq10 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 192_pheS

CGGATATGTAAGATACTTCTATATTTTCAGACGAGATATTGATTCGGACACATACTTACCAGTCCAAGCGCGGACAATGGAA
AAGCATGATTTCTCTAAGGGTGTCTACGAATGATTTGCCAGGAAAAGTTTTCCGCAGAGATACAGATGATGCGACCCACA
GCCATCAGTTCATCAAATTGAAGGGCTAGTTGTTGATAAAAAACATCACGATGGGCGACCTTAAAGGAACATTAGAAGTCGT
AATGAAAAAATGTTTGGGGAAGATCGTGAATCCGTTTGCCTCAAGTTATTTCCATTTACGGAGCCATCAGTAGAAGTAG
ATGTCAGCTGTTTCAAATGTGGTGGTGCCGGTTGTAACGTATGTAATACACTGGATGGATCGAGATTTTAGGAGCCGG

>Seq11 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 77_PheS

CATGCAAGATACGTTTTATATTTTCAGATGAGATGTTAATTCGTACGCATACTTACCAGTTCAAGCTCGAACAAATGGAAAAAC
ACGATTTTCAAAGGTGCATTACGAATGATTTCTCTGGGAAAAGTATCCGTCGTGATACAGATGATGCGACACATAGTCAC
CAATCCATCAAATTGAAGGCTTGTGTGCGATAAAAAATGTCACAATGGGTGATTTAAAAGGGACGTTAGAAGTCATGATGA
AAAAAATGTTTGGTGAAGATCGTAAAATTCGTTTACGCTTACGTAATTTCCCTTTACAGAACCCTCAGTGAAGTAGATGTTA
GCTGTTTTAAATGTGGCGGCGAGGTTGTAACGTCTGCAAAACATACAGGTTGGATTGAAATTTTAGGAGCCGGCAAGCACCC
ACCC

>Seq12 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 110_pheS

CGGATATGCAAGATACTTCTATATTTTCAGACGAGATATTGATTCGGACACATACTTACCAGTCCAAGCACGGACAATGGAA
AAGCATGATTTCTCTAAGGGTGTCTACGAATGATCTGCCAGGAAAAGTTTTCCGCAGAGATACAGATGATGCGACCCACA
GCCATCAGTTCATCAAATTGAAGGGCTAGTTGTTGATAAAAAACATCACGATGGGCGACCTTAAAGGAACATTAGAAGTCGT
AATGAAAAAATGTTTGGGGAAGAACGTGAAATCCGTTTGCCTCAAGTTATTTCCATTTACGGAGCCATCAGTAGAAGTA
GATGTCAGCTGTTTCAAATGTGGTGGTGCCGGTTGTAACGTATGTAATACACTGGCTGGATCGAGATTTTAGGAGCCGGT

>Seq13 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 154_pheS

TATGCAAGATACTTCTATATTTTCAGACGAGATATTGATTCGGACACATACTTACCAGTCCAAGCACGGACAATGGAAAAAGC
ATGATTTCTCTAAGGGTGTCTACGAATGATCTGCCAGGAAAAGTTTTCCGCAGAGATACAGATGATGCGACCCACAGCCAT
CAGTTCATCAAATTGAAGGCTAGTTGTTGATAAAAAACATCACGATGGGCGACCTTAAAGGAACATTAGAAGTCGTAATGA
AAAAAATGTTTGGGGAAGAACGTGAAATCCGTTTGCCTCAAGTTATTTCCATTTACGGAGCCATCAGTAGAAGTAGATGTC
AGCTGTTTCAAATGTGGTGGTGCCGGTTGTAACGTATGTAATACACTGGCTGGATCGAGATTTTAGGGGG

Annexe 5 : Séquences du gène *rpoA*

Seq1 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 20_rpoA

AAAACCAAGAATCGCAAAAATTGATGAAGAAAAAGATTATGGCAAGTTCATCGTTGAACCTCTTGAAAGAGGGTATGGGACT
ACTTTAGGGAATCCCTACGTCGATTTTATTATCTTCTTTGCCAGGTGCTGCCATCACTAATATTCAAATCGATGGTGTACTG
CATGAATTTCTTACCATCAAAGGTGTTAGAGAAGACGTCCTCAAATCATCTTGAACATTAAGGCTTAGCGCTGAAAATGTA
TGGCCAAGAAGAAAAACCCTTGAAATCGATATTACCGGACCTGCTACAGTAACCTGCTGGCGATATTATCGTTGATAGTAT
GTAGAAAATCTTAACAAAAGATATGTACATCTGTAGTGTCTCTGAAGGAGCTACGTTCCATGCTCGCTTAAACAGTGAAACCTGG
ACGTGTTATGTTCAAGCAGATGAAAATAAAAAAGAAGATATGCCAATTGGCGTCTTCCAGTCGATTCAATCTACACACCTG
TTCGTCGTGTGAATCAAGTTGAGAACACACGTTGGACACCGTGAAGATTTTGATAAATTGACGATGGAGATTTGGACA
GATGTTCAATTGAACCGTGGAAAGCAATGAGTTTGTCTGCGAAAATCATGACTGAACATTTGGATATTTTGTGAACTTAC
TGATGAAGCAAAAAATGCTGAAATCATGGTTCGAAAAAGAAGAAACAAAAAGAAAAATGTTGAAATGACGATCGAAG
AGTTAGACTTGTCTGTTCCGCTTTACATTTGTTGAAACGCGCC

>Seq2 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 25_rpoA

TGAAAAACCAAGAATCGCAAAAATTGATGAAGAAAAAGATTATGGCAAGTTCATCGTTGAACCTCTTGAAAGAGGGTATGGG
ACTACTTTAGGGAATCCCTACGTCGATTTTATTATCTTCTTTGCCAGGTGCTGCCATCACTAATATTCAAATCGATGGTGTAT
CTGCATGAATTTCTACCATCAAAGGTGTTAGAGAAGACGTCCTCAAATCATCTTGAACATTAAGGCTTAGCGCTGAAAAT
GTATGGCCAAGAAGAAAAACCCTTGAAATCGATATTACCGGACCTGCTACAGTAACCTGCTGGCGATATTATCGTTGATAGT
GATGTAGAAATTTAAACAAAAGATATGTACATCTGTAGTGTCTCTGAAGGAGCTACGTTCCATGCTCGCTTAAACAGTGAAACC
TGGACGTGGTTATGTTCAAGCAGATGAAAATAAAAAAGAAGATATGCCAATTGGCGTCTTCCAGTCGATTCAATCTACACAC
CTGTTCTGTCGTGAACTATCAAGTTGAGAACACACGTTGGACACCGTGAAGATTTTGATAAATTGACGATGGAGATTTGG
ACAGATGGTTCAATCGAACCGTTGGAAGCAATGAGTTTATCTGCGAAAATCATGACTGAACATTTGGATATTTTGTGAACTT
AACTGATGAAGCAAAAAATGCTGAAATCATGGTTCGAAAAAGAAGAAACAAAAAGAAAAATGTTGAAATGACGATCGA
AGAGTTAGACTTGTCTGTTCCGCTTTACAATGTTTGAACGCGCC

>Seq3 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 31_rpoA

AAAACCAAGAATCGCAAAAATTGATGAAGAAAAAGATTATGGCAAGTTCATCGTTGAACCTCTTGAAAGAGGGTATGGGACT
ACTTTAGGGAATCCCTACGTCGATTTTATTATCTTCTTTGCCAGGTGCTGCCATCACTAATATTCAAATCGATGGTGTACTG
CATGAATTTCTTACCATCAAAGGTGTTAGAGAAGACGTCCTCAAATCATCTTGAACATTAAGGCTTAGCGCTGAAAATGTA
TGGCCAAGAAGAAAAACCCTTGAAATCGATATTACCGGACCTGCTACAGTAACCTGCTGGCGATATTATCGTTGATAGTAT
GTAGAAAATCTTAACAAAAGATATGTACATCTGTAGTGTCTCTGAAGGAGCTACGTTCCATGCTCGCTTAAACAGTGAAACC
ACGTGTTATGTTCAAGCAGATGAAAATAAAAAAGAAGATATGCCAATTGGCGTCTTCCAGTCGATTCAATCTACACACCTG
TTCGTCGTGTGAATCAAGTTGAGAACACACGTTGGACACCGTGAAGATTTTGATAAATTGACGATGGAGATTTGGACA
GATGTTCAATTGAACCGTTGGAAGCAATGAGTTTGTCTGCGAAAATCATGACTGAACATTTGGATATTTTGTGAACTTAA

TGATGAAGCAAAAAATGCTGAAATCATGGTCGAAAAAGAAGAACACAAAAAGAAAAATGTTGGAAATGACGATCGAAG
AGTTAGACTTGTCTGTTTCGCTTACATTGTTTGAACGCGCC

>Seq4 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 65-rpoA

TTGAAAACCAAGAATCGCAAAAAATTGATGAAGAAAAAGATTATGGCAAGTTCATCGTTGAACCTCTTGAAAGAGGGTATGGG
ACTACTTTAGGGAATCCCTACGTCGTATTTTATTATCTTCTTTGCCAGGTGCTGCCATCACTAATATTCAAATCGATGGTGT
CTGCATGAATTCTTACCATCAAAGGTGTTAGAGAAGACGTCCTCAAAATCATCTTGAACATTAAGGCTTAGCGCTGAAAAAT
GTATGGCCAAGAAGAAAAAACCCCTTGAAATCGATATTACCGGACCTGCTACAGTAACCTGCTGGCGATATTATCGTTGATAGT
GATGTAGAAATCTTAAACAAAGATATGTACATCTGTAGTGTCTCTGAAGGAGCTACGTTCCATGCTCGCTAACAGTGAACCC
TGGACGTGGTTATGTTCAAGCAGATGAAAAATAAAAAAGAAGATATGCCAATTGGCGTCTTCCAGTCGATTCAATCTACACAC
CTGTTCTGTCGTGAACTATCAAGTTGAGAACACACGTTGGACACCGTGAAGATTTTGATAAATTGACGATGGAGATTTGG
ACAGATGGTTCAATCGAACCGTTGGAAGCAATGAGTTTATCTGCGAAAAATCATGACTGAACATTTGGATATTTTGTGAACTT
AACTGATGAAGCAAAAAATGCTGAAATCATGGTCGAAAAAGAAGAACACAAAAAGAAAAATGTTGGAATGACGATCGA
AGAGTTAGACTTGTCTGTTTCGCTTACAATTGTTTGAACGCGCC

>Seq5 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 66-rpoA

TGAAAACCAAGAATCGCAAAAAATTGATGAAGAAAAAGATTATGGCAAGTTCATCGTTGAACCTCTTGAAAGAGGGTATGGG
ACTACTTTAGGGAATCCCTACGTCGTATTTTATTATCTTCTTTGCCAGGTGCTGCCATCACTAATATTCAAATCGATGGTGT
CTGCATGAATTCTTACCATCAAAGGTGTTAGAGAAGACGTCCTCAAAATCATCTTGAACATTAAGGCTTAGCGCTGAAAAAT
GTATGGCCAAGAAGAAAAAACCCCTTGAAATCGATATTACCGGACCTGCTACAGTAACCTGCTGGCGATATTATCGTTGATAGT
GATGTAGAAATCTTAAACAAAGATATGTACATCTGTAGTGTCTCTGAAGGAGCTACGTTCCATGCTCGCTAACAGTGAACCC
TGGACGTGGTTATGTTCAAGCAGATGAAAAATAAAAAAGAAGATATGCCAATTGGCGTCTTCCAGTCGATTCAATCTACACAC
CTGTTCTGTCGTGAACTATCAAGTTGAGAACACACGTTGGACACCGTGAAGATTTTGATAAATTGACGATGGAGATTTGG
ACAGATGGTTCAATCGAACCGTTGGAAGCAATGAGTTTATCTGCGAAAAATCATGACTGAACATTTGGATATTTTGTGAACTT
AACTGATGAAGCAAAAAATGCTGAAATCATGGTCGAAAAAGAAGAACACAAAAAGAAAAATGTTGGAATGACGATCGA
AGAGTTAGACTTGTCTGTTTCGCTTACAATTGTTTGAACGCGCCGA

>Seq6 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 67-rpoA

GAAAACCAAGAATCGCAAAAAATTGATGAAGAAAAAGATTATGGCAAGTTCATCGTTGAACCTCTTGAAAGAGGGTATGGGA
CTACTTTAGGGAATCCCTACGTCGTATTTTATTATCTTCTTTGCCAGGTGCTGCCATCACTAATATTCAAATCGATGGTGTACT
GCATGAATTCTTACCATCAAAGGTGTTAGAGAAGACGTCCTCAAAATCATCTTGAACATTAAGGCTTAGCGCTGAAAAATGT
ATGGCCAAGAAGAAAAAACCCCTTGAAATCGATATTACCGGACCTGCTACAGTAACCTGCTGGCGATATTATCGTTGATAGTGA
TGTAGAAATCTTAAACAAAGATATGTACATCTGTAGTGTCTCTGAAGGAGCTACGTTCCATGCTCGCTAACAGTGAACCCCTG
GACGTGGTTATGTTCAAGCAGATGAAAAATAAAAAAGAAGATATGCCAATTGGCGTCTTCCAGTCGATTCAATCTACACACCT
GTTCTGTCGTGAACTATCAAGTTGAGAACACACGTTGGACACCGTGAAGATTTTGATAAATTGACGATGGAGATTTGG
AGATGGTTCAATCGAACCGTTGGAAGCAATGAGTTTATCTGCGAAAAATCATGACTGAACATTTGGATATTTTGTGAACTTAA
CTGATGAAGCAAAAAATGCTGAAATCATGGTCGAAAAAGAAGAACACAAAAAGAAAAATGTTGGAATGACGATCGAAG
AGTTAGACTTGTCTGTTTCGCTTAAAATTGTTTGAACG

>Seq7 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 80-rpoA

TGAAAACCAAGAATCGCAAAAAATTGATGAAGAAAAAGATTATGGCAAGTTCATCGTTGAACCTCTTGAAAGAGGGTATGGG
ACTACTTTAGGGAATCCCTACGTCGTATTTTATTATCTTCTTTGCCAGGTGCTGCCATCACTAATATTCAAATCGATGGTGTACT
CTGCATGAATTCTTACCATCAAAGGTGTTAGAGAAGACGTCCTCAAAATCATCTTGAACATTAAGGCTTAGCGCTGAAAAAT
GTATGGCCAAGAAGAAAAAACCCCTTGAAATCGATATTACCGGACCTGCTACAGTAACCTGCTGGCGATATTATCGTTGATAGT
GATGTAGAAATCTTAAACAAAGATATGTACATCTGTAGTGTCTCTGAAGGAGCTACGTTCCATGCTCGCTAACAGTGAACCC
TGGACGTGGTTATGTTCAAGCAGATGAAAAATAAAAAAGAAGATATGCCAATTGGCGTCTTCCAGTCGATTCAATCTACACAC
CTGTTCTGTCGTGAACTATCAAGTTGAGAACACACGTTGGACACCGTGAAGATTTTGATAAATTGACGATGGAGATTTGG
ACAGATGGTTCAATCGAACCGTTGGAAGCAATGAGTTTATCTGCGAAAAATCATGACTGAACATTTGGATATTTTGTGAACTTAA
AACTGATGAAGCAAAAAATGCTGAAATCATGGTCGAAAAAGAAGAACACAAAAAGAAAAATGTTGGAATGACGATCGA
AGAGTTAGACTTGTCTGTTTCGCTTACAATTGTTTGAACGTC

>Seq8 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 101-rpoA

TGAAAACCAAGAATCGCAAAAAATTGATGAAGAAAAAGATTATGGCAAGTTCATCGTTGAACCTCTTGAAAGAGGGTATGGGA
CTACTTTAGGGAATCCCTACGTCGTATTTTATTATCTTCTTTGCCAGGTGCTGCCATCACTAATATTCAAATCGATGGTGTACT
GCATGAATTCTTACCATCAAAGGTGTTAGAGAAGACGTCCTCAAAATCATCTTGAACATTAAGGCTTAGCGCTGAAAAATGT
ATGGCCAAGAAGAAAAAACCCCTTGAAATCGATATTACCGGACCTGCTACAGTAACCTGCTGGCGATATTATCGTTGATAGTGA
TGTAGAAATCTTAAACAAAGATATGTACATCTGTAGTGTCTCTGAAGGAGCTACGTTCCATGCTCGCTAACAGTGAACCCCTG
GACGTGGTTATGTTCAAGCAGATGAAAAATAAAAAAGAAGATATGCCAATTGGCGTCTTCCAGTCGATTCAATCTACACACCT
GTTCTGTCGTGAACTATCAAGTTGAGAACACACGTTGGACACCGTGAAGATTTTGATAAATTGACGATGGAGATTTGGAC
AGATGGTTCAATCGAACCGTTGGAAGCAATGAGTTTATCTGCGAAAAATCATGACTGAACATTTGGATATTTTGTGAACTTAA
CTGATGAAGCAAAAAATGCTGAAATCATGGTCGAAAAAGAAGAACACAAAAAGAAAAATGTTGGAATGACGATCGAAG
AGTTAGACTTGTCTGTTTCGCTTACAATTGTTTGAACGCGCCAGA

>Seq9 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 191-rpoA

CAAGAATCGCAAAAAATTGATGAAGAAAAAGATTATGGCAAGTTCATCGTTGAACCTCTTGAAAGAGGGTATGGGACTACTTT
AGGGAATCCCTACGTCGTATTTTATTATCTTCTTTGCCAGGTGCTGCCATCACTAATATTCAAATCGATGGTGTACTGCATGA
ATTCTTACCATCAAAGGTGTTAGAGAAGACGTCCTCAAAATCATCTTGAACATTAAGGCTTAGCGCTGAAAAATGTATGGCC
AAGAAGAAAAAACCCCTTGAAATCGATATTACCGGACCTGCTACAGTAACCTGCTGGCGATATTATCGTTGATAGTGTAGTA
AATCTTAAACAAAGATATGTACATCTGTAGTGTCTCTGAAGGAGCTACGTTCCATGCTCGCTAACAGTGAACCCCTGGACGTG
GTTATGTTCAAGCAGATGAAAAATAAAAAAGAAGATATGCCAATTGGCGTCTTCCAGTCGATTCAATCTACACACCTGTTCTG
CGTGTGAACATCAAGTTGAGAACACACGTTGGACACCGTGAAGATTTTGATAAATTGACGATGGAGATTTGGACAGATG
GTTCAATCGAACCGTTGGAAGCAATGAGTTTATCTGCGAAAAATCATGACTGAACATTTGGATATTTTGTGAACTTAACTGAT
GAAGCAAAAAATGCTGAAATCATGGTCGAAAAAGAAGAACACAAAAAGAAAAATGTTGGAATGACGATCGAAGAGTT
AGACTTGTCTGTTTCGCTTACAATTGTTTGAACGCGCC

>Seq10 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 192-rpoA

TGAAAACCAAGAATCGCAAAAAATTGATGAAGAAAAAGATTATGGCAAGTTCATCGTTGAACCTCTTGAAAGAGGGTATGGGA
CTACTTTAGGGAATCCCTACGTCGTATTTTATTATCTTCTTTGCCAGGTGCTGCCATCACTAATATTCAAATCGATGGTGTACT
GCATGAATTCTTACCATCAAAGGTGTTAGAGAAGACGTCCTCAAAATCATCTTGAACATTAAGGCTTAGCGCTGAAAAATGT
ATGGCCAAGAAGAAAAAACCCCTTGAAATCGATATTACCGGACCTGCTACAGTAACCTGCTGGCGATATTATCGTTGATAGTGA

TGTAGAAATTCCTAACAAAAGATATGTACATCTGTAGTGTCTCTGAAGGAGCTACGTTCCATGCTCGCTAACAGTGAAACCTG
 GACGTGGTTATGTTCAAGCAGATGAAAATAAAAAAGAAAGATATGCCAATTGGCGTCTTCCAGTCCGATTCAATCTACACACCT
 GTTCGTCGTGAACTATCAAGTTGAGAACACACAGTGTGGACACCCGTGAAGATTTTGATAAAATGACGATGGAGATTTGGAC
 AGATGGTTCAATCGAACCGTTAGAAGCAATGAGTTTATCTGCGAAAAATCATGACTGAACATTTGGATATTTTTGTGAACTTAA
 CTGATGAAGCAAAAAATGCTGAAATCATGGTCAAAAAAGAAACACAAAAAGAAAAATGTTGGAAATGACCGATCCGA
 AGAGTTAGACTTGTCTGTTCCGCTTTACATTTGGTTTGA

>Seq11 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 77_rpoA

TTTTTATGTTTGAAGTTGAAAAACCAAGAATCGAAAAAATTGATGAAAAATAGAGATTATGGTAAGTTCGTCGTTGAACCATT
 AGAACGCGGTTACGGAACACTTTAGGTAACCTCTACGTCGATTTTATTGTCTTCTTACCAGGAGCTGCAATTACGAATAT
 TCAAATCGATGGTGTTTTACACGAATTCTCAACCATTCCAGGTGTACGAGAAGACGTAACACAAATATTTTGAATATTAAG
 GCTTAGCATTGAAATTATATGCTGAAGAAGAGAAAAACCTTGAGATCGATATTACAGGACCCGCTACCGTGACTGCCGGGA
 TATTATCGTGGACAGTGTGTTGAGATCCTAAATAAAGATTTAGTTATCTGTAGTGTGCTGAAGGAGCTACTTCCATGCTCG
 CTTAACAGTGAACCTGGTCTGGCTATGTTCAAGCAGACGAAAAACAAAAAAGAAGATATGCCAATCGGTGTAATCCAGTT
 GATTCATCTACACACCCGTTTCGTCGTGTTAACTACCAAGTAGAAAAATACACGTGTTGGTCGTCGTGATGATTTCCGACAAAT
 AACAAATGAAAAATATGGACAGATGGTTCAATCATCTCAAGAAGCACTAAGTTTACGTCGAAAAATCATGACTGAGCATT
 GATATCTTTGTAACCTTACTGACGAAGCGAAAAACGCTGAAATCATGGTGGAAAAAGAAGAACTCAAAAAGAGAAAAATG
 CTAGAAATGACGATTGAAGAACTTGATTTATCAGTTCGTTCAATAACTGTTTTAAAACGCGCCGCTCAAACCGGAATAAAA

>Seq12 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 110_rpoA

ATTGCAAAAAATTGATGAAGAAAAAGATTATGGCAAGTTTCATCGTTGAACTCTTGAAAAGAGGGTATGGGACTACTTTAGGGA
 ATTCCTACGTCGATTTTATTATCTTCTTTGCCAGGTGCTGCCATCACTAATATTCAAATCGATGGTGTACTGCATGAATTCTC
 TACCATCAAAGGTGTAGAGAAGACGTCCTCAAAATCATCTTGAACATTAAGGCTTAGCGCTGAAAAATGATGGCCAAGAA
 GAAAAACCTTGAAATCGATATTACCGACCTGCTACAGTAACTGCTGGCGATATTATCGTTGATAGTGATGTAGAAATCT
 TAACAAAGATATGTACATCTGTAGTGTCTCTGAAGGAGCTACGTTCCATGCTCGCTAACAGTGAAACCTGGACGTGGTTATG
 TTCAAGCAGATGAAAAATAAAAAAGAAGATATGCCAATTGGCGTCTTCCAGTCGATTCAATCTACACACCTGTTTCGTCGTG
 AACTATCAAGTTGAGAACACACGTGTTGGACACCGTGAAGATTTGATAAAATTGACGATGGAGATTTGGACAGATGGTTCAA
 TCGAACCGTTGGAAGCAATGAGTTTATCTGCGAAAAATCATGACTGAACATTTGGATATTTTTGTGAACTTAACTGATGAAGCA
 AAAAAATGCTGAAATCATGGTCAAAAAAGAAGAAACACAAAAAGAAAAATGTTGGAAATGACGATCGAAGAGTTAGACTTG
 TCTGTTCCGCTTTACAATTGTATGAAACGCGCCGCTCAA

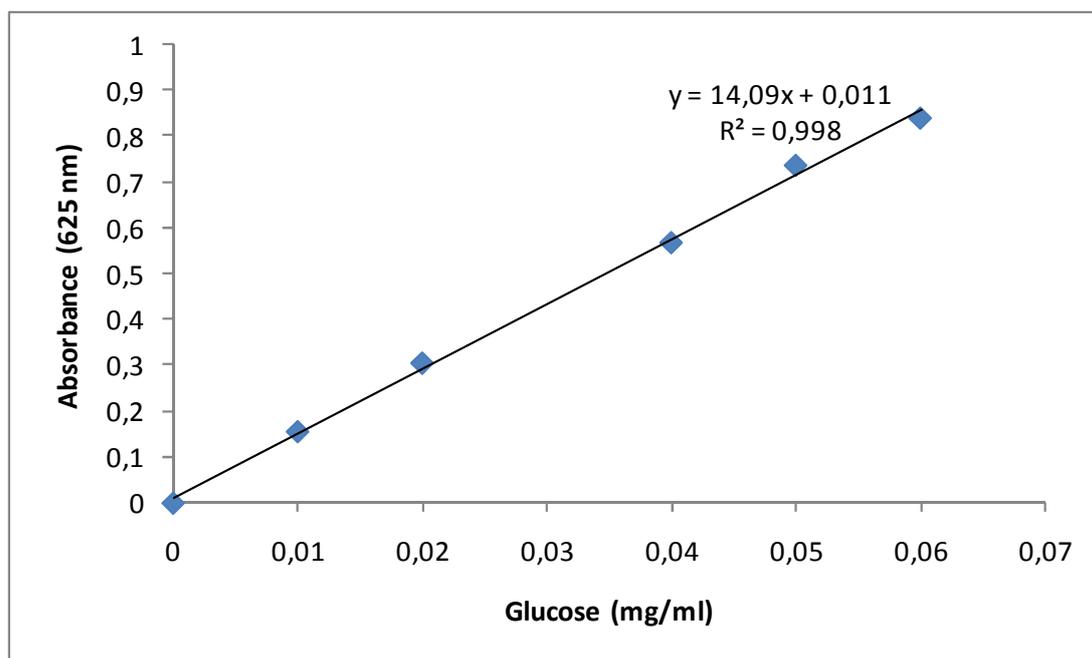
>Seq13 [organism=Enterococcus faecium] E. faecium 154-rpoA

CGCAAAAAATTGATGAAGAAAAAGATTATGGCAAGTTTCATCGTTGAACTCTTGAAAAGAGGGTATGGGACTACTTTAGGGAAT
 TCCCTACGTCGATTTTATTATCTTCTTTGCCAGGTGCTGCCATCACTAATATTCAAATCGATGGTGTACTGCATGAATTCTCTA
 CCATCAAAGGTGTAGAGAAGACGTCCTCAAAATCATCTTGAACATTAAGGCTTAGCGCTGAAAAATGATGGCCAAGAAGA
 AAAAAACCTTGAAATCGATATTACCGACCTGCTACAGTAACTGCTGGCGATATTATCGTTGATAGTGATGTAGAAATCTTA
 ACAAAGATATGTACATCTGTAGTGTCTCTGAAGGAGCTACGTTCCATGCTCGCTAACAGTGAACCTGGACGTGGTTATGTT
 CAAGCAGATGAAAAATAAAAAAGAAGATATGCCAATTGGCGTCTTCCAGTCGATTCAATCTACACACCTGTTTCGTCGTGAA
 CTATCAAGTTGAGAACACACGTGTTGGACACCGTGAAGATTTGATAAAATTGACGATGGAGATTTGGACAGATGGTTCAATC
 GAACCGTTGGAAGCAATGAGTTTATCTGCGAAAAATCATGACTGAACATTTGGATATTTTTGTGAACTTAACTGATGAAGCAA
 AAATGCTGAAATCATGGTCAAAAAAGAAGAAACACAAAAAGAAAAATGTTGGAAATGACGATCGAAGAGTTAGACTTGT
 GTTCGCTCT

Annexe 6 : Solution d'anthrone

Anthrone (Sigma-Aldrich)	0,2 g
H ₂ SO ₄ à 72%	1000 ml

Annexe 7 : Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'amidon



Annexe 8: Standards des analyses CPG /SM

Des composés standards, neutres, avec différents points d'ébullition et fonctions chimiques ont été choisis: quatre esters (acétate d'éthyle, propanoate, butanoate d'éthyle et hexanoate d'éthyle), deux aldéhydes (3-méthylbutanal et benzaldéhyde), une cétone (2-heptanone), le 2,3-butanedione, le disulfure de diméthyle et le 3-méthylbutanol. Une première solution de composés a été préparée en combinant environ 100 mg de chaque composé, à l'exception du 3-méthylbutanol (5000 mg). Un aliquote de ce mélange (7 mg) est dilué dans 750 mg de méthanol (SigmaAldrich, 99,8%). Cette solution mère est conservée et congelée à -20°C. Le jour de l'utilisation, la solution d'actions est diluée dans de l'eau bouillie et déminéralisée pour préparer des solutions des standards à des concentrations allant de 5 à 1200 ng/g pour chacun (de 260 à 50 000 ng / g pour le 3-méthylbutanol).

Pour les acides gras à chaîne courte, le mélange des standards 46975-U (Supelco, Sigma Aldrich) contient les acides acétique, propanoïque, butanoïque, 2-méthylpropanoïque, pentanoïque, 3-méthylbutanoïque, hexanoïque, le 4-méthyl- pentanoïque et heptanoïque, à 10 mM chacun, est utilisé pour préparer des solutions standards de 20 à 1000 ng / g de chacun. Pour les acides acétique et propanoïques, des solutions standards à des concentrations jusqu'à 5000 µg / g sont également préparés à partir des composés purs (Sigma Aldrich, 99%) dilués

dans l'eau déminéralisée bouillie. Le pH de ces solutions standards acides est ajusté à $6,35 \pm 0,15$ avec le NaOH.

Annexe 9: Variations des paramètres physicochimiques du blé fermenté sur la base de la matière sèche

Temps (mois)	Acidité							
	pH	Humidité (%)	Cendres (%)	Protéines (%)	Acidité titrable (%)	Acidité grasse (mg/100g)	Matière grasse (%)	Amidon (mg/g)
<i>V</i>								
0	4,02±0,00	9,87±0,03	1,90±0,01	10,1±0,15	0,01±0,0000	27,63±1,41	1,43±0,02	795,60 ±02,52
3	4,51±0,00	8,78±0,01	1,74±0,03	9,53±0,05	0,16±0,0008	51,96±0,93	1,46±0,02	679,42±25,54
6	4,95±0,01	9,02±0,05	1,74±0,03	8,97±0,06	0,23±0,0008	66,61±0,93	1,57±0,00	631,36±14,06
9	4,61±0,02	8,85±0,06	1,79±0,01	9,61±0,06	0,24±0,0008	65,17±0,93	1,88±0,00	635,09±26,02
12	4,50± 0,01	9,43±0,08	1,78±0,03	9,88±0,00	0,18±0,0008	80,16±0,94	1,90±0,00	648,04±05,58
24	4,39± 0,03	9,68±0,03	1,76±0,01	9,76±0,03	0,24±0,0008	122,9±2,81	2,32±0,03	578,42±13,91
<i>E</i>								
0	8,30±0,00	9,87±0,03	1,90±0,01	10,1±0,15	0,01±0,0000	27,63±1,41	1,43±0,02	795,60 ±02,52
3	4,54±0,00	8,75±0,19	1,75±0,01	9,72±0,04	0,15±0,0008	80,24±1,86	1,67±0,007	670,23±28,10
6	4,27±0,01	9,00±0,08	1,74±0,01	9,14±0,04	0,21±0,0008	96,26±1,86	1,70±0,007	628,87±08,23
9	4,36±0,01	9,29±0,03	1,84±0,02	9,93±0,01	0,21±0,0008	80,03±0,93	1,75±0,00	614,84±02,00
12	4,74±0,01	9,81±0,08	1,81±0,01	9,93±0,03	0,20±0,0008	79,16±0,94	1,76±0,00	609,28±12,57
24	4,23±0,02	8,21±0,05	1,86±0,01	9,33±0,08	0,25±0,0008	114,4±2,77	2,12±0,03	590,15±13,96

(E) blé fermenté sans vinaigre ; (V) blé fermenté avec vinaigre

Annexe 10 : Résultats statistiques des paramètres physico-chimiques

- ANOVA

	Temps	Type d'échantillons	Interaction
Humidité .Pr.F.	8,16 10-08	0,008	1,79 10-07
Cendres.Pr.F.	0,0016	0,009	0,004711134
Protéines.Pr.F.	3,19 10-09	0,00049603	5,82 10-06
AT.Pr.F.	6,09 10-20	7,26 10-08	8,90 10-12
AG.Pr.F.	6,52 10-13	3,98 10-08	6,18 10-08
Matière grasse .Pr.F.	1,38 10-06	3,00 10-08	3,53 10-08
Amidon.Pr.F.	0,0321	0,61	0,01006528

- Test LSD (E/V)

pH.trt	E	V
pH.means	5,07416667	4,49833333
pH.M	a	b
pH.std.err	0,43804742	0,08380925
pH.LCI	4,11974333	4,31572867
pH.UCI	6,02859001	4,680938
Humidité.trt	V	E
Humidité.means	9,27916667	9,16
Humidité.M	a	b
Humidité.std.err	0,12659562	0,1776104
Humidité.LCI	9,0033385	8,77302018
Humidité.UCI	9,55499484	9,54697982
Cendres.trt	E	V
Cendres.means	1,83741667	1,77916667
Cendres.M	a	b
Cendres.std.err	0,01941979	0,01448397
Cendres.LCI	1,79510458	1,74760881
Cendres.UCI	1,87972875	1,81072452
Protéines.trt	E	V
Protéines.means	9,58916667	9,54
Protéines.M	a	a
Protéines.std.err	0,0920018	0,08952738
Protéines.LCI	9,38871197	9,3449366
Protéines.UCI	9,78962136	9,7350634
AT.trt	E	V
AT.means	0,17614583	0,17072917
AT.M	a	b
AT.std.err	0,02431128	0,02325972
AT.LCI	0,12317611	0,12005059
AT.UCI	0,22911556	0,22140775
AG.trt	E	V
AG.means	79,6233333	69,0741667
AG.M	a	b
AG.std.err	7,97687836	8,75521044
AG.LCI	62,2432084	49,9982018
AG.UCI	97,0034582	88,1501315
Amidon.trt	V	E
Amidon.means	700,495	680,916667
Amidon.M	a	a
Amidon.std.err	17,4388349	19,5684218
Amidon.LCI	662,499043	638,280738
Amidon.UCI	738,490957	723,552595

N : 12

- Test LSD (temps)

Humidité.trt	T0	T12	T9	T6	T24	T3
Humidité.means	9,89	9,6225	9,0725	9,0125	8,95	8,77
Humidité.M	a	b	c	c	c	d
Cendres.trt	T9	T0	T24	T12	T6	T3
Cendres.means	1,864	1,855	1,81125	1,8	1,7695	1,75
Cendres.M	a	ab	bc	c	cd	d
Protéines.trt	T12	T9	T3	T24	T0	T6
Protéines.means	9,905	9,7725	9,6275	9,5475	9,48	9,055
Protéines.M	a	b	c	d	d	e
AT.trt	T24	T9	T6	T12	T3	T0
AT.means	0,243125	0,2225	0,22125	0,18875	0,155	0,01
AT.M	a	b	b	c	d	e
AG.trt	T24	T6	T12	T9	T3	T0
AG.means	118,6525	81,4375	79,665	72,6025	66,105	27,63
AG.M	a	b	b	c	d	e
Amidon.trt	T0	T6	T24	T9	T3	T12
Amidon.means	760,605	715,1225	687,2925	682,47	662,58	636,165
Amidon.M	a	ab	bc	bc	bc	c

Annexe 11 : Résultats statistiques des acides aminés libres

- ANOVA

	Temps	Type d'échantillons	Interaction
Asp.Pr..F.	9,1510 ⁻¹²	0,198	0,092
Thr.Pr..F.	7,3610 ⁻¹⁴	0,072	0,0071808
Ser.Pr..F.	5,6610 ⁻¹⁴	0,225	0,010746
Asn.Pr..F.	3,2810 ⁻⁰⁷	0,502	0,0326612
Glu.Pr..F.	3,5010 ⁻¹³	0,117	0,0001334
Gln.Pr..F.	7,3110 ⁻¹⁰	0,07	0,0102098
Gly.Pr..F.	2,4010 ⁻¹³	0,0374553	0,202
Ala.Pr..F.	2,2210 ⁻¹³	0,0005184	0,0393841
Cit.Pr..F.	7,9310 ⁻¹³	0,13	4,0510 ⁻⁰⁶
Val.Pr..F.	5,4710 ⁻¹⁴	0,055	0,0047753
Cys.Pr..F.	1,6310 ⁻⁰⁶	0,303	0,063
Met.Pr..F.	2,9410 ⁻¹⁴	0,0010607	0,0003563
Ile.Pr..F.	3,4010 ⁻¹³	0,185	0,0025917
Leu.Pr..F.	2,0910 ⁻¹⁴	0,0117228	0,0021755
Tyr.Pr..F.	6,0610 ⁻¹⁵	9,8510 ⁻⁰⁸	2,4310 ⁻⁰⁶
β.Ala.Pr..F.	1,2810 ⁻¹²	0,583	1,0610 ⁻⁰⁸
Phe.Pr..F.	2,4110 ⁻¹⁴	0,0072823	0,0004505
Hcy.Pr..F.	3,3310 ⁻¹⁰	0,868	1,6710 ⁻⁰⁷
GABA.Pr..F.	6,4310 ⁻¹²	0,932	3,4410 ⁻⁰⁵
EA.Pr..F.	1,8710 ⁻⁰⁹	0,375	0,0078046
Orn.Pr..F.	5,2910 ⁻¹³	3,8210 ⁻⁰⁸	3,3710 ⁻⁰⁸
Lys.Pr..F.	5,7710 ⁻¹³	0,0003424	0,0004265
His.Pr..F.	4,2910 ⁻¹³	0,0077769	6,1810 ⁻⁰⁵
Trp.Pr..F.	2,2510 ⁻⁰⁵	0,0444843	0,0111467
Arg.Pr..F.	8,9010 ⁻¹¹	8,9310 ⁻⁰⁶	2,6410 ⁻⁰⁵
Pro.Pr..F.	4,3910 ⁻¹⁴	0,99	0,0003548

- Test LSD (E/V)

Asp.trt	E		V
Asp.means		1,56216667	1,51
Asp.M	a		a
Thr.trt	E		V
Thr.means		1,36908333	1,32166667
Thr.M	a		a
Ser.trt	E		V
Ser.means		1,75808333	1,7175
Ser.M	a		a
Asn.trt	E		V
Asn.means		0,76225	0,74083333
Asn.M	a		a
Glu.trt	E		V
Glu.means		1,91891667	1,85916667
Glu.M	a		a
Gln.trt	E		V
Gln.means		0,96525	0,85416667
Gln.M	a		a
Gly.trt	E		V
Gly.means		1,29291667	1,23666667
Gly.M	a		b
Ala.trt	E		V
Ala.means		2,05725	1,8875
Ala.M	a		b
Cit.trt	E		V
Cit.means		0,17558333	0,1675
Cit.M	a		a
Val.trt	E		V
Val.means		1,99616667	1,9225
Val.M	a		a
Cys.trt	E		V
Cys.means		0,15358333	0,13916667
Cys.M	a		a
Met.trt	E		V
Met.means		0,65658333	0,61
Met.M	a		b
Ile.trt	E		V
Ile.means		3,02325	2,9325
Ile.M	a		a
Leu.trt	E		V
Leu.means		3,17266667	3,02
Leu.M	a		b
Tyr.trt	V		E
Tyr.means		1,1375	0,95875
Tyr.M	a		b
β.Ala.trt	E		V
β.Ala.means		0,66875	0,65583333
β.Ala.M	a		a
Phe.trt	E		V
Phe.means		2,17683333	2,05666667
Phe.M	a		b
Hcy.trt	E		V
Hcy.means		0,04375	0,04333333
Hcy.M	a		a
GABA.trt	V		E
GABA.means		0,69916667	0,69791667
GABA.M	a		a
EA.trt	V		E
EA.means		0,09333333	0,09
EA.M	a		a
Orn.trt	E		V
Orn.means		0,65375	0,505
Orn.M	a		b
Lys.trt	E		V
Lys.means		1,30958333	1,1875
Lys.M	a		b

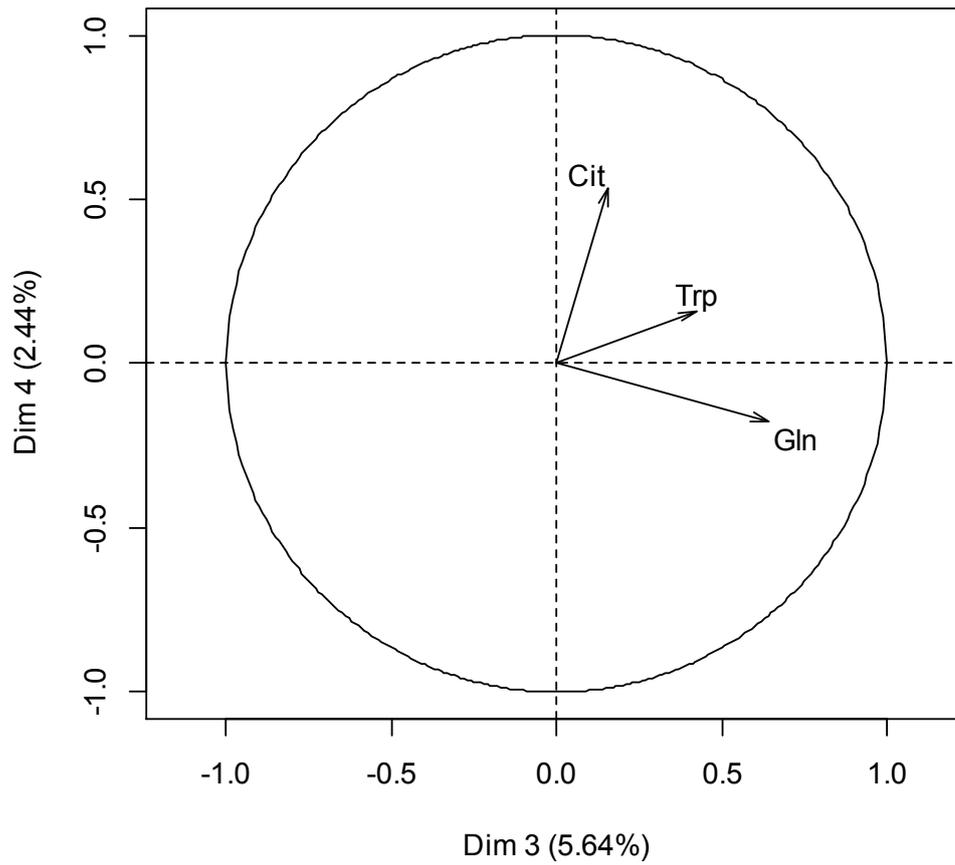
N :12

• Test LSD (temps)

Asp.trt	T24	T9	T12	T6	T3	T0
Asp.means	2,291	1,95625	1,8415	1,70925	1,24825	0,17025
Asp.M	a	b	bc	c	d	e
Thr.trt	T24	T9	T6	T12	T3	T0
Thr.means	1,9695	1,74025	1,735	1,4735	1,12425	0,02975
Thr.M	a	b	b	c	d	e
Ser.trt	T24	T9	T6	T12	T3	T0
Ser.means	2,6525	2,297	2,1625	2,042	1,23175	0,041
Ser.M	a	b	c	d	e	f
Asn.trt	T6	T9	T24	T3	T12	T0
Asn.means	1,06675	0,87425	0,8355	0,73575	0,662	0,335
Asn.M	a	b	bc	cd	d	e
Glu.trt	T24	T6	T9	T12	T3	T0
Glu.means	2,63025	2,528	2,41825	1,964	1,58475	0,209
Glu.M	a	ab	b	c	d	e
Gln.trt	T3	T6	T9	T12	T24	T0
Gln.means	2,1805	1,12425	1,0275	0,83425	0,176	0,11575
Gln.M	a	b	bc	c	d	d
Gly.trt	T24	T9	T6	T12	T3	T0
Gly.means	1,82825	1,58525	1,567	1,48175	1,0685	0,058
Gly.M	a	b	bc	c	d	e
Ala.trt	T24	T9	T6	T12	T3	T0
Ala.means	2,78075	2,49725	2,40625	2,3025	1,722	0,1255
Ala.M	a	b	bc	c	d	e
Cit.trt	T9	T12	T6	T24	T3	T0
Cit.means	0,33575	0,2625	0,1925	0,146	0,0925	0
Cit.M	a	b	c	d	e	f
Val.trt	T24	T9	T6	T12	T3	T0
Val.means	2,9495	2,563	2,412	2,26825	1,5045	0,05875
Val.M	a	b	c	d	e	f
Cys.trt	T6	T9	T12	T24	T3	T0
Cys.means	0,26125	0,2135	0,1795	0,11475	0,10925	0
Cys.M	a	ab	b	c	c	d
Met.trt	T24	T6	T9	T12	T3	T0
Met.means	0,9375	0,85225	0,82575	0,67825	0,506	0
Met.M	a	b	b	c	d	e
Ile.trt	T24	T9	T6	T12	T3	T0
Ile.means	4,589	3,975	3,803	3,38375	2,0865	0,03
Ile.M	a	b	b	c	d	e
Leu.trt	T24	T9	T6	T12	T3	T0
Leu.means	4,69625	4,0905	3,92725	3,46625	2,328	0,06975
Leu.M	a	b	b	c	d	e
Tyr.trt	T6	T24	T9	T12	T3	T0
Tyr.means	1,50175	1,50025	1,404	1,10425	0,74275	0,03575
Tyr.M	a	a	b	c	d	e
β.Ala.trt	T12	T24	T9	T3	T6	T0
β.Ala.means	1,36175	1,0345	0,961	0,31325	0,30325	0
β.Ala.M	a	b	b	c	c	d
Phe.trt	T24	T9	T6	T12	T3	T0
Phe.means	3,3635	2,79125	2,752	2,31425	1,44625	0,03325
Phe.M	a	b	b	c	d	e
Hcy.trt	T12	T24	T9	T3	T6	T0
Hcy.means	0,0925	0,0685	0,0605	0,02375	0,016	0
Hcy.M	a	b	b	c	c	d
GABA.trt	T12	T24	T3	T9	T6	T0
GABA.means	0,89175	0,824	0,805	0,79175	0,76875	0,11
GABA.M	a	b	bc	bc	c	d
EA.trt	T12	T9	T24	T6	T3	T0
EA.means	0,11425	0,11375	0,1125	0,108	0,1015	0
EA.M	a	a	a	a	a	b
Orn.trt	T6	T3	T9	T24	T12	T0
Orn.means	0,8475	0,71125	0,70675	0,6935	0,51725	0
Orn.M	a	b	b	b	c	d
Lys.trt	T6	T24	T9	T3	T12	T0
Lys.means	1,7275	1,625	1,5385	1,30125	1,2395	0,0595
Lys.M	a	b	b	c	c	d
His.trt	T6	T24	T9	T12	T3	T0
His.means	0,76825	0,76825	0,71625	0,55575	0,46125	0,005
His.M	a	a	b	c	d	e
Trp.trt	T3	T6	T9	T12	T0	T24
Trp.means	0,394	0,24425	0,21025	0,1375	0,064	0
Trp.M	a	b	bc	cd	de	e
Arg.trt	T6	T9	T24	T12	T3	T0
Arg.means	1,47575	1,30325	1,12125	1,0675	0,85825	0,163

Arg.M	a	b	c	c	d	e
Pro.trt	T24	T9	T12	T6	T3	T0
Pro.means	6,19625	4,5625	4,4	3,6825	1,58725	0,03875
Pro.M	a	b	b	c	d	e

Annexe 12 : Axes 3-4 (ACP acides aminés libres)



Annexe 13 : Résultats de l'analyse statistique des composés volatils

- ANOVA

Volatils	Temps	Type d'échantillons	Interaction
Ethanol.pr.F	0,0028	0,002	0,19
Butanol.Pr..F.	1,6010 ⁻⁰⁷	0,0007259	0,000433244
Pentanol.Pr..F.	3,8810 ⁻¹¹	0,007	5,2110 ⁻⁰⁵
Hexanol.Pr..F.	9,7710 ⁻¹⁶	0,1	0,2
Pentanal.Pr..F.	8,7410 ⁻⁰⁹	0,52	0,08
Hexanal.Pr..F.	7,7510 ⁻¹⁴	0,62	0,00164327
Nonanal.Pr..F.	2,1110 ⁻⁰⁸	0,0004741	0,001496628
Diacetyl.Pr..F.	8,8010 ⁻¹⁶	0,53	1,0310 ⁻¹⁰
Pentanedione.Pr..F.	1,1610 ⁻⁰⁸	0,002	9,9310 ⁻¹²
Acetoin.Pr..F.	1,6210 ⁻⁰⁶	0,002	3,5510 ⁻⁰⁸
Butanediol.pr..F.	0,6	0,74	0,82
Methylpropanal.Pr..F.	1,0310 ⁻¹²	0,06	0,000433728
3.methylbutanal.Pr..F.	2,1210 ⁻⁰⁹	0,18	0,07
2.methylbutanal.Pr..F.	4,8610 ⁻¹¹	0,4	0,24
3.methylbutanol.Pr..F.	5,5810 ⁻⁰⁷	0,009	3,5410 ⁻⁰⁸
2.methylbutanol.Pr..F.	2,7410 ⁻¹⁰	2,4910 ⁻⁰⁷	8,4810 ⁻¹¹
3.methylbutanoic.acid.Pr..F.	4,1210 ⁻¹⁸	1,9210 ⁻⁰⁷	3,7610 ⁻¹²
2.methylbutanoic.acid.Pr..F.	2,4210 ⁻¹⁴	1,1710 ⁻¹³	7,5410 ⁻¹⁸
DMS.pr..F.	1,7410 ⁻⁰⁹	2,8710 ⁻⁰⁶	1,3310 ⁻⁰⁵
DMDS.pr..F.	4,2210 ⁻⁰⁹	0,45	0,029869496
Methional.Pr..F.	5,5410 ⁻⁰⁵	0,65	0,61
Benzaldehyde.Pr..F.	2,2210 ⁻⁰⁷	0,9	0,00584627
Benzeneacetaldehyde.Pr..F.	0,00214	0,72	0,15
Phenylethanol.Pr..F.	0,91	0,26	0,16
2butanone.Pr..F.	0,0439	0,15	0,29
Ethyl_C2.Pr..F.	1,6410 ⁻¹⁶	0,13	7,1610 ⁻¹⁹
Propyl_C2.Pr..F.	3,3110 ⁻¹⁹	3,1710 ⁻¹⁴	2,8310 ⁻¹⁹
Butyl_C2.Pr..F.	1,0410 ⁻⁰⁹	2,7510 ⁻⁰⁶	5,9710 ⁻¹⁰
3.methylbutyl_C2.Pr..F.	5,9710 ⁻¹⁴	0,33	7,8510 ⁻¹⁶
Ethylc4.Pr..F.	4,6010 ⁻¹²	1,1010 ⁻⁰⁶	3,6710 ⁻¹⁰
Propyl_C4.Pr..F.	9,2510 ⁻¹⁹	4,0710 ⁻¹³	3,8010 ⁻¹⁸
Butyl_C4.Pr..F.	8,1510 ⁻¹⁶	4,1110 ⁻⁰⁹	7,6410 ⁻¹³
Ethyl.2hydroxypropanoate.Pr..F.	2,1010 ⁻¹⁴	3,0810 ⁻⁰⁵	2,6010 ⁻⁰⁵
Ethyl.3.hydroxybutanoate.Pr..F.	8,0110 ⁻⁰⁷	0,32	4,6010 ⁻⁰⁹
1.2.propanediol..2.acetate.pr..f.	1,1210 ⁻⁰⁹	1,4610 ⁻⁰⁵	6,9610 ⁻¹⁰
Furfural.Pr..F.	6,2410 ⁻¹¹	0,59	6,5310 ⁻⁰⁵
2furanmethanol.Pr..F.	1,3310 ⁻¹¹	0,9	0,002265228
C2.pr..f.	0,007	0,7	0,33
C3.pr..f.	1,0110 ⁻⁰⁶	2,8310 ⁻⁰⁵	8,9810 ⁻⁰⁷
C4.pr..f.	4,2610 ⁻¹²	0,04	2,6010 ⁻¹⁰
C6.pr..f.	0,00432	0,54	0,88

- Test LSD (E/V)

Ethanol.means		706611111	438176471
Ethanol.M	a		b
Ethanol.std.err		81270915,4	48561228,4
Ethanol.LCI		538489413	337719916
Ethanol.UCI		874732809	538633025
Dimethyl.sulfide.trt	V		E
Dimethyl.sulfide.means		98694444,4	63617647,1
Dimethyl.sulfide.M	a		b
Dimethyl.sulfide.std.err		14198194,4	7761458,49
Dimethyl.sulfide.LCI		69323241,6	47561846,9
Dimethyl.sulfide.UCI		128065647	79673447,2
Methylpropanal.trt	V		E
Methylpropanal.means		8871111111	8310588235
Methylpropanal.M	a		a
Methylpropanal.N		18	18
Methylpropanal.std.err		1150871477	1158119822
Methylpropanal.LCI		6490352072	5914834851
Methylpropanal.UCI		1,13E+10	1,07E+10
Diacetyl.trt	V		E
Diacetyl.means		545500000	544647059
Diacetyl.M	a		a
Diacetyl.std.err		96818820,4	82844332,3
Diacetyl.LCI		345215010	373270500
Diacetyl.UCI		745784990	716023617
2butanone.trt	E		V
2butanone.means		160588235	141222222
2butanone.M	a		a
2butanone.std.err		9411764,71	10041923,7
2butanone.LCI		141118517	120448920
2butanone.UCI		180057954	161995524
Ethyl_C2.trt	V		E
Ethyl_C2.means		526166667	497941176
Ethyl_C2.M	a		a
Ethyl_C2.std.err		119192869	135826529
Ethyl_C2.LCI		279597431	216962594
Ethyl_C2.UCI		772735902	778919759
3.methylbutanal.trt	V		E
3.methylbutanal.means		8,50E+09	7877058824
3.methylbutanal.M	a		a
3.methylbutanal.std.err		966731996	977752812
3.methylbutanal.LCI		6495162500	5854423027
3.methylbutanal.UCI		1,05E+10	9899694620
2.methylbutanal.trt	E		V
2.methylbutanal.means		8297647059	7936666667
2.methylbutanal.M	a		a
2.methylbutanal.std.err		1052871260	972961586
2.methylbutanal.LCI		6119616915	5923942277
2.methylbutanal.UCI		1,05E+10	9949391057
Butanol.trt	E		V
Butanol.means		2339470588	1609500000
Butanol.M	a		b
Butanol.std.err		370057260	202295539
Butanol.LCI		1573948821	1191019793
Butanol.UCI		3104992356	2027980207
Pentanedione.trt	E		V
Pentanedione.means		50698000	33913888,9
Pentanedione.M	a		b
Pentanedione.std.err		15269909,4	5943878,39
Pentanedione.LCI		19109785,6	21618039,6
Pentanedione.UCI		82286214,4	46209738,2
Pentanal.trt	V		E
Pentanal.means		164555556	133470588
Pentanal.M	a		a
Pentanal.std.err		28777285,7	34643257,3
Pentanal.LCI		105025205	61805550,4

Pentanal.UCI		224085907	205135626
Acetoin.trt	E		V
Acetoin.means		463294118	224388889
Acetoin.M	a		b
Acetoin.std.err		150746982	56245269,3
Acetoin.LCI		151450225	108036684
Acetoin.UCI		775138010	340741093
Propyl_C2.trt	E		V
Propyl_C2.means		167576471	7188888,89
Propyl_C2.M	a		b
Propyl_C2.std.err		83108779,9	1853946,31
Propyl_C2.LCI		4347139,53	3353708,75
Propyl_C2.UCI		339500081	11024069
3.methylbutanol.trt	V		E
3.methylbutanol.means		619944444	393152941
3.methylbutanol.M	a		b
3.methylbutanol.std.err		191811496	96350744,9
3.methylbutanol.LCI		223152133	193836240
3.methylbutanol.UCI		1016736756	592469643
2.methylbutanol.trt	V		E
2.methylbutanol.means		506500000	138647059
2.methylbutanol.M	a		b
2.methylbutanol.std.err		173879273	27343262
2.methylbutanol.LCI		146803318	82083211,7
2.methylbutanol.UCI		866196682	195210906
DMDS.trt	E		V
DMDS.means		1,98E+08	187555556
Dmds.m	a		a
DMDS.std.err		22334522,2	16235848
Dmds.lci		151797521	153969145
Dmds.uci		244202479	221141966
Pentanol.trt	E		V
Pentanol.means		111570588	97227777,8
Pentanol.M	a		a
Pentanol.std.err		32868049,2	22472034,6
Pentanol.LCI		43577848,1	50740832,3
Pentanol.UCI		179563328	143714723
Ethylc4.trt	V		E
Ethylc4.means		56325555,6	18662352,9
Ethylc4.M	a		b
Ethylc4.std.err		21193947,1	4552903,37
Ethylc4.LCI		12482535,5	9243954,74
Ethylc4.UCI		100168576	28080751,1
Hexanal.trt	V		E
Hexanal.means		1027222222	888235294
Hexanal.M	a		b
Hexanal.std.err		200798741	206180666
Hexanal.LCI		611838379	461718090
Hexanal.UCI		1442606066	1314752498
Butanediol.trt	E		V
Butanediol.means		343235294	311611111
Butanediol.M	a		a
Butanediol.std.err		48867582,9	51859106,4
Butanediol.LCI		242144997	204332376
Butanediol.UCI		444325591	418889846
Butyl_C2.trt	E		V
Butyl_C2.means		173788235	74133333,3
Butyl_C2.M	a		b
Butyl_C2.std.err		52524283,5	11080239,1
Butyl_C2.LCI		65133476,5	51212112,3
Butyl_C2.UCI		282442994	97054554,4
Ethyl.2hydrxypropanoate.trt	E		V
Ethyl.2hydrxypropanoate.means		1028294118	797833333
Ethyl.2hydrxypropanoate.M	a		b
Ethyl.2hydrxypropanoate.std.err		170678981	107524773
Ethyl.2hydrxypropanoate.LCI		675217745	575401393
Ethyl.2hydrxypropanoate.UCI		1381370490	1020265273

Furfural.trt	E		V
Furfural.means		794705882	791666667
Furfural.M	a		a
Furfural.std.err		109855947	85593124,8
Furfural.LCI		567451541	614603798
Furfural.UCI		1021960224	968729536
2furanmethanol.trt	E		V
2furanmethanol.means		728411765	717944444
2furanmethanol.M	a		a
2furanmethanol.std.err		96656268,6	86176383,7
2furanmethanol.LCI		528463039	539675013
2furanmethanol.UCI		928360490	896213876
2.methylbutanoic.acid.trt	V		E
2.methylbutanoic.acid.means		70694444,4	28682352,9
2.methylbutanoic.acid.M	a		b
2.methylbutanoic.acid.N		18	18
2.methylbutanoic.acid.std.err		15675532,5	10050476,4
2.methylbutanoic.acid.LCI		38267134,9	7891358,42
2.methylbutanoic.acid.UCI		103121754	49473347,5
Hexanol.trt	E		V
Hexanol.means		73470588,2	69911111,1
Hexanol.M	a		a
Hexanol.std.err		29726216,1	28239731,1
Hexanol.LCI		11977225,1	11492776,5
Hexanol.UCI		134963951	128329446
3.methylbutyl_C2.trt	V		E
3.methylbutyl_C2.means		17894444,4	17441176,5
3.methylbutyl_C2.M	a		a
3.methylbutyl_C2.std.err		4350940,64	3770834,85
3.methylbutyl_C2.LCI		8893837,98	9640610,25
3.methylbutyl_C2.UCI		26895050,9	25241742,7
1.2.propanediol..2.acetate.trt	V		E
1.2.propanediol..2.acetate.means		41422222,2	10247058,8
1.2.propanediol..2.acetate.M	a		b
1.2.propanediol..2.acetate.std.err		17980462,4	637730,215
1.2.propanediol..2.acetate.LCI		4226801,74	8927813,36
1.2.propanediol..2.acetate.UCI		78617642,7	11566304,3
Propyl_C4.trt	E		V
Propyl_C4.means		259252941	20844444,4
Propyl_C4.M	a		b
Propyl_C4.std.err		128573155	4636394,97
Propyl_C4.LCI		-6720894,4	11253330,7
Propyl_C4.UCI		525226777	30435558,2
Methylthional.trt	V		E
Methylthional.means		138933333	132635294
Methylthional.M	a		a
Methylthional.std.err		19580757,9	18598177,4
Methylthional.LCI		98427449,6	94162033
Methylthional.UCI		179439217	171108555
Ethyl.3.hydroxybutanoate.trt	E		V
Ethyl.3.hydroxybutanoate.means		483176471	4,05E+08
Ethyl.3.hydroxybutanoate.M	a		a
Ethyl.3.hydroxybutanoate.std.err		134770972	131677612
Ethyl.3.hydroxybutanoate.LCI		204381473	132604106
Ethyl.3.hydroxybutanoate.UCI		761971468	677395894
Benzaldehyde.trt	E		V
Benzaldehyde.means		167588235	167166667
Benzaldehyde.M	a		a
Benzaldehyde.N		18	18
Benzaldehyde.std.err		19402292,7	15681522
Benzaldehyde.LCI		127451535	134726967
Benzaldehyde.UCI		207724936	199606366
Butyl_C4.trt	E		V
Butyl_C4.means		121676471	65694444,4
Butyl_C4.M	a		b
Butyl_C4.std.err		23902651,1	21204396,6
Butyl_C4.LCI		72230069,5	21829808

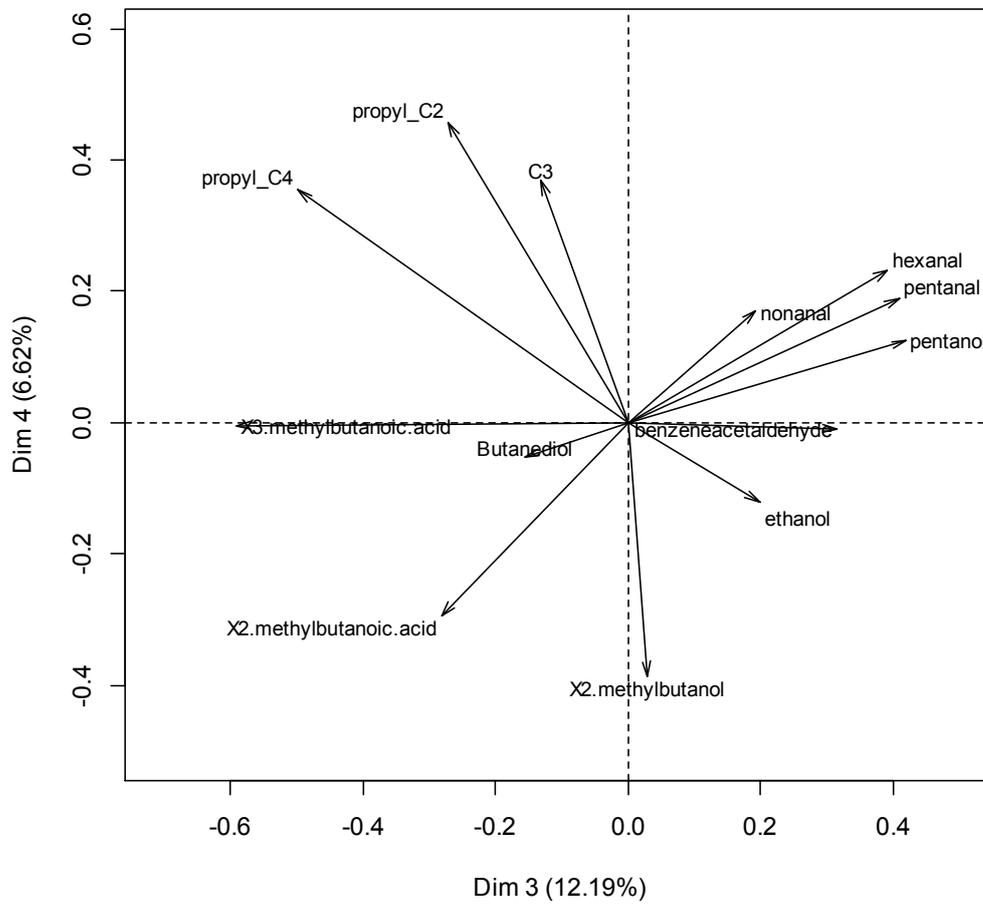
Butyl_C4.UCI		171122872	109559081
Benzeneacetaldehyde.trt	E		V
Benzeneacetaldehyde.means		641941176	622944444
Benzeneacetaldehyde.M	a		a
Benzeneacetaldehyde.std.err		94931959,8	89536076,4
Benzeneacetaldehyde.LCI		445559455	437724959
Benzeneacetaldehyde.UCI		838322898	808163930
Nonanal.trt	E		V
Nonanal.means		55411764,7	45611111,1
Nonanal.M	a		b
Nonanal.std.err		6107528,4	3570154,87
Nonanal.LCI		42777379,6	38225683,1
Nonanal.UCI		68046149,8	52996539,2
Phenylethanol.trt	E		V
Phenylethanol.means		203647059	176111111
Phenylethanol.M	a		a
Phenylethanol.std.err		16927384,1	16984208,1
Phenylethanol.LCI		168630097	140976600
Phenylethanol.UCI		238664021	211245623
C2.trt	E		V
C2.means		2,76E+10	2,59E+10
C2.M	a		a
C2.std.err		3799856012	3465325962
C2.LCI		1,97E+10	1,88E+10
C2.UCI		3,54E+10	3,31E+10
C3.trt	E		V
C3.means		2168523529	448605556
C3.M	a		b
C3.std.err		729616469	69597118,1
C3.LCI		659196868	304632947
C3.UCI		3677850191	592578164
C4.trt	V		E
C4.means		3,02E+10	2,73E+10
C4.M	a		a
C4.std.err		5885504793	4204680001
C4.LCI		1,80E+10	1,86E+10
C4.UCI		4,23E+10	3,60E+10
C6.trt	V		E
C6.means		110333333	1,08E+08
C6.M	a		a
C6.std.err		18152945	19309590,7
C6.LCI		72781105,5	68055068,2
C6.UCI		147885561	147944932
3.methylbutanoic.acid.trt	E		V
3.methylbutanoic.acid.means		335764706	241611111
3.methylbutanoic.acid.M	a		b
3.methylbutanoic.acid.std.err		49995994,6	53212617
3.methylbutanoic.acid.LCI		232340111	131532426
3.methylbutanoic.acid.UCI		439189301	351689796

N:18

• Test LSD (temps)

Ethanol.trt	T24	T6	T3	T9	T12	T0
Ethanol.means	7,65E+08	7,00E+08	6,66E+08	646666667	5,85E+08	109666667
Ethanol.M	a	a	a	a	a	b
Butanol.trt	T9	T24	T12	T6	T3	T0
Butanol.means	3316666667	2583333333	2,20E+09	2166666667	1,36E+09	5,70E+07
Butanol.M	a	b	b	b	c	d
Pentanol.trt	T0	T3	T24	T6	T9	T12
Pentanol.means	2,60E+08	2,48E+08	50700000	40600000	33833333,3	1,60E+07
Pentanol.M	a	a	b	b	b	b
Hexanol.trt	T0	T3	T24	T6	T9	T12
Hexanol.means	3266666667	22080000	19833333,3	19333333,3	17666666,7	1,60E+07
Hexanol.M	a	b	b	b	b	b
Pentanal.trt	T3	T6	T12	T9	T24	T0
Pentanal.means	3,84E+08	2583333333	89333333,3	82833333,3	6,40E+07	57333333,3
Pentanal.M	a	b	c	c	c	c
Hexanal.trt	T6	T3	T9	T12	T0	T24
Hexanal.means	2,20E+09	2,04E+09	501666667	458333333	4,30E+08	308333333
Hexanal.M	a	a	b	b	b	b
Nonanal.trt	T3	T9	T6	T12	T24	T0
Nonanal.means	74400000	69333333,3	57333333,3	43500000	3,60E+07	25666666,7
Nonanal.M	a	a	b	c	cd	d
Diacetyl.trt	T24	T9	T12	T6	T3	T0
Diacetyl.means	1,05E+09	743333333	686666667	393333333	3,50E+08	19666666,7
Diacetyl.M	a	b	b	c	c	d
Pentanedione.trt	T24	T6	T12	T9	T3	T0
Pentanedione.means	89433333,3	56666666,7	44500000	30502666,7	28400000	616666,667
Pentanedione.M	a	b	bc	cd	d	e
Acetoin.trt	T9	T24	T12	T3	T6	T0
Acetoin.means	896333333	406666667	3,05E+08	2,30E+08	120833333	65333333,3
Acetoin.M	a	b	bc	bc	c	c
Butanediol.trt	T12	T24	T9	T6	T0	T3
Butanediol.means	435833333	423333333	350333333	269166667	243333333	222400000
Butanediol.M	a	a	a	a	a	a
Methylpropanal.trt	T24	T6	T9	T12	T3	T0
Methylpropanal.means	1,28E+10	1,17E+10	1,09E+10	1,04E+10	5,02E+09	1,60E+08
Methylpropanal.M	a	ab	b	b	c	d
3.methylbutanal.trt	T24	T6	T12	T9	T3	T0
3.methylbutanal.means	1,14E+10	1,04E+10	9,65E+09	9,65E+09	7,72E+09	236666667
3.methylbutanal.M	a	ab	b	b	c	d
2.methylbutanal.trt	T24	T6	T9	T12	T3	T0
2.methylbutanal.means	1,28E+10	9766666667	9616666667	9333333333	6,70E+09	186666667
2.methylbutanal.M	a	b	b	b	c	d
3.methylbutanol.trt	T24	T9	T12	T6	T3	T0
3.methylbutanol.means	1263766667	6,92E+08	5,30E+08	266333333	155600000	9,20E+07
3.methylbutanol.M	a	b	bc	cd	d	d
2.methylbutanol.trt	T24	T12	T9	T6	T3	T0
2.methylbutanol.means	1081833333	274166667	232333333	154833333	114600000	73666666,7
2.methylbutanol.M	a	b	bc	bc	bc	c
3.methylbutanoic.acid.trt	T9	T12	T6	T24	T0	T3
3.methylbutanoic.acid.means	478333333	456666667	448333333	238500000	43666666,7	12800000
3.methylbutanoic.acid.M	a	a	a	b	c	c
2.methylbutanoic.acid.trt	T12	T6	T9	T24	T3	T0
2.methylbutanoic.acid.means	82166666,7	76383333,3	64716666,7	62800000	5900000	23666666,7
2.methylbutanoic.acid.M	a	a	b	b	c	c
DMS.trt	T3	T9	T12	T6	T24	T0
DMS.means	124600000	1,16E+08	1,13E+08	74833333,3	67166666,7	1500000
Dms.m	a	a	a	b	b	c
DMDS.trt	T24	T9	T6	T12	T3	T0
DMDS.means	313333333	218333333	206666667	186666667	1,52E+08	7,20E+07
Dmds.m	a	b	b	bc	c	d
Methional.trt	T24	T9	T12	T6	T3	T0
Methional.means	2,20E+08	176666667	151666667	151666667	107600000	2933333,33
Methional.M	a	ab	bc	bc	c	d
Benzaldehyde.trt	T9	T12	T24	T6	T3	T0
Benzaldehyde.means	241666667	196666667	188333333	1,75E+08	1,66E+08	36333333,3
Benzaldehyde.M	a	b	b	b	b	c
Benzeneacetaldehyde.trt	T3	T6	T24	T9	T12	T0
Benzeneacetaldehyde.means	8,98E+08	8,20E+08	811666667	801666667	401666667	104333333
Benzeneacetaldehyde.M	a	a	a	a	b	b
Phenylethanol.trt	T6	T24	T9	T3	T12	T0
Phenylethanol.means	215333333	201833333	198333333	175800000	173333333	1,70E+08
Phenylethanol.M	a	a	a	a	a	a
X2butanone.trt	T24	T9	T6	T12	T3	T0
X2butanone.means	178333333	178333333	1,60E+08	153333333	122400000	106666667

X2butanone.M	a	a	ab	abc	bc	c
Ethyl_C2.trt	T12	T24	T3	T9	T6	T0
Ethyl_C2.means	986666667	804833333	5,50E+08	533333333	199166667	7,00E+06
Ethyl_C2.M	a	b	c	c	d	e
Propyl_C2.trt	T12	T9	T24	T3	T6	T0
Propyl_C2.means	4,40E+08	2,20E+07	1,40E+07	9,90E+06	5,70E+06	1,70E+06
Propyl_C2.M	a	b	b	b	b	b
Butyl_C2.trt	T9	T6	T3	T24	T12	T0
Butyl_C2.means	335166667	137166667	1,02E+08	96166666,7	52166666,7	9133333,33
Butyl_C2.M	a	b	bc	bc	cd	d
3.methylbutyl_C2.trt	T24	T9	T12	T6	T3	T0
3.methylbutyl_C2.means	32500000	27533333,3	23333333,3	10816666,7	8180000	2100000
3.methylbutyl_C2.M	a	b	c	d	d	e
Ethylc4.trt	T12	T9	T24	T6	T3	T0
Ethylc4.means	1,40E+08	3,90E+07	2,00E+07	1,60E+07	4,30E+06	3,20E+05
Ethylc4.M	a	b	c	c	c	c
Propyl_C4.trt	T12	T9	T6	T24	T3	T0
Propyl_C4.means	7,10E+08	2,90E+07	2,30E+07	1,70E+07	9,20E+06	5,40E+06
Propyl_C4.M	a	b	b	b	b	b
Butyl_C4.trt	T12	T9	T24	T6	T3	T0
Butyl_C4.means	223333333	156166667	76500000	61833333,3	25800000	2500000
Butyl_C4.M	a	b	c	c	d	e
Ethyl.2hydroxypropanoate.trt	T6	T24	T3	T9	T12	T0
Ethyl.2hydroxypropanoate.means	188333333	1,11E+09	8,34E+08	808333333	746666667	63666666,7
Ethyl.2hydroxypropanoate.M	a	b	c	c	c	d
Ethyl.3.hydroxybutanoate.trt	T24	T9	T12	T3	T6	T0
Ethyl.3.hydroxybutanoate.means	888333333	8,60E+08	379333333	2,74E+08	1,90E+08	3,80E+07
Ethyl.3.hydroxybutanoate.M	a	a	b	bc	bc	c
1.2.propanediol.2.acetate.trt	T24	T12	T3	T9	T6	T0
1.2.propanediol.2.acetate.means	1,10E+08	1,10E+07	1,10E+07	1,00E+07	8,80E+06	8,40E+06
1.2.propanediol.2.acetate.m	a	b	b	b	b	b
Furfural.trt	T6	T9	T24	T3	T12	T0
Furfural.means	1078333333	1,03E+09	1006666667	9,58E+08	686666667	26666666,7
Furfural.M	a	a	a	a	b	c
2furanmethanol.trt	T6	T24	T9	T12	T3	T0
2furanmethanol.means	1,09E+09	956666667	9,45E+08	781666667	4,52E+08	67666666,7
2furanmethanol.M	a	b	b	c	d	e
C2.trt	T24	T12	T3	T6	T9	T0
C2.means	3,58E+10	3,38E+10	3,33E+10	3,03E+10	2,58E+10	2233333333
C2.m	a	a	a	a	a	b
C3.trt	T12	T6	T24	T9	T3	T0
C3.means	4,30E+09	1,10E+09	8,10E+08	7,20E+08	6,30E+08	7,20E+07
C3.m	a	b	b	b	b	b
C4.trt	T12	T6	T9	T24	T3	T0
C4.means	4,82E+10	4,38E+10	3,72E+10	2,85E+10	9,26E+09	2,30E+09
C4.m	a	a	b	c	d	e
C6.trt	T0	T3	T12	T9	T6	T24
C6.means	233333333	112600000	89500000	8,40E+07	78500000	57833333,3
C6.m	a	b	b	b	b	b

Annexe 14 : Axes 3-4 (ACP des composés volatiles)

RESUMES

Abstract:

In Algeria, fermented durum wheat *lemzeiet* is used to produce couscous also named *lemzeiet*. Historically the fermentation was carried out in underground silos called *matmor*. Nowadays the wheat's fermentation is made outside the *matmor* inside utensils of different shapes and sizes, by a new fast uncontrolled process. The fermentation of wheat in *matmor* has been progressively abandoned due to rural exodus and the expansion of modern wheat storage methods.

In order to master this new process and in an approach of making it valuable, we conducted a survey of wheat fermentation conditions applied outside the *matmor*. Following the obtained results, two types of fermentation (V and E), with and without initial addition of vinegar, were reproduced at laboratory scale in plastic jerrycans of 10 L.

The microbial communities present, in the two samples, were monitored and analysed by conventional microbiological farming methods. The results showed that the fermentation favours the disappearance of fungi flora since the first months with the settlement of a dominant lactic flora. This dominant flora, deriving from the two samples' types, was defined and monitored by culture-independent (PCR-TTGE) and culture-dependent methods by coupling different molecular methods (ARNr 16S/pheS/rpoA gene sequencing and species-specific PCR). 69 isolates were identified as belonging to 16 species represented by 6 genera (*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, and *Streptococcus*). TTGE revealed similar results us cultutre-dependent methods, with a characteristic band assigned to *Pediococcus.sp.* The strain typing of *Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.*, and *Enterococcus spp.*, by RAPD and PFGE, showed a very important intraspecies diversity.

To study the effect of LAB's activity on the matrix changes, we analysed physico-chemical composition and characteristics of fermented wheat. The results showed that fermentation favours the increase of fat acidity, titratable acidity and a significant drop of pH. The free amino-acids' profiles and the volatile compounds were also evaluated using cation exchange chromatography and gas chromatography-mass spectrometry (CG-MS) respectively. 40 volatile aroma compounds and the 25 free amino acids showed a distinct effect of fermentation compared to non-fermented wheat (used as a control sample). Our results demonstrated an increase of proteogenic free amino acids and non-proteogenic ones (mainly ornithine and GABA). The hydrolytic activities of the isolated LAB species, belonging to 24 strains, were also highlighted using the API-ZYM kit.

This study enabled the exploration of a new fermentation process of wheat with the determination of a large diversity of colonizing LAB and their interactions with the matrix of fermented wheat.

Key words: Fermentation- Durum Wheat- Vinegar- Ecosystem- Lactic Acid Bacteria- Diversity- Interaction- Microbiota- Matrix.

ملخص

في الجزائر، يستخدم القمح الصلب المخمر لمزيت لصنع الكسكسي المسمى أيضا لمزيت. تاريخيا يخمر القمح في صوامع تحت الأرض المعروفة بالمطمور لكن حاليا يتم تخميره خارج المطمور في أواني مختلفة الأشكال والأحجام، وفقا لطريقة جديدة سريعة و غير متحكم فيها. وقد تم التخلي عن تخمير القمح في المطمور تدريجيا بسبب النزوح الريفي وتوسيع الطرق الحديثة لتخزينه.

لإتقان هذه الطريقة الجديدة ومن اجل الرفع من قيمتها أجرينا تحقيق حول ظروف تخمير القمح خارج المطمور. بعد معاينة النتائج المحصل عليها، نوعان من القمح المخمر مع أو بدون إضافة أولية للخل (V و E) ، تمت إعادة إنتاجهما على مستوى المختبر في جراكن بلاستيكية بسعة عشر لترات. قمنا بتتبع المجتمعات الميكروبية المتواجدة ، في كلا النوعين و تحليلها بواسطة طرق العزل الميكروبيولوجية التقليدية. أظهرت النتائج اختفاء الفطريات ابتداء من الأشهر الأولى و استقرار بكتيريا حمض اللاكتيك المهيمنة. هذه البكتيريا السائدة، من هذين النوعين (V و E) ، تم تمييزها وتحديد بطرق العزل المستقلة (TTGE -PCR) وطرق العزل المرتبطة بالاعتماد على أساليب جزيئية مختلفة (تسلسل الجينات PCR ، ARNr 16S / pheS / rpoA محددة الأنواع). حددت 69 عزلة تنتمي إلى 16 نوعا و تمثل ستة أجناس (*Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Weissella Streptococcus*)

أظهرت TTGE نتائج مشابهة لنتائج طرق العزل المرتبطة مع سيادة شريحة مميزة مسندة الى *P. pentosaceus*. تصنيف الفصائل التي تنتمي الى *Lactobacillus spp., Pediococcus spp., Enterococcus spp.* بواسطة RAPD و PFGE، أظهر اختلاف مهم داخل النوع.

لتبيين تأثير نشاط بكتيريا حمض اللاكتيك على التغييرات في المصفوفة ، قمنا بتحليل التركيبية والخصائص الفيزيوكيميائية للقمح المخمر. أظهرت النتائج ان التخمر حفز ارتفاع مستويات الحموضة الدهنية، الحموضة المعاييرة وانخفاض pH. جرى كذلك تقييم لمحات الأحماض الأمينية الحرة و المركبات الطيارة باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني الموجب والكروماتوغرافيا الغازية إلى جانب قياس الطيف الكتلي (CPG-SM) على التوالي. 40 مركب عطري طيار و 25 حمض أميني تم تحديدها، بينت هذه الاخيرة الاثر الواضح لتخمير القمح مقارنة بالقمح غير المخمر (المستعمل كشاهد).

نتائجنا بينت ارتفاع نسب الأحماض الأمينية الحرة البروتينية و الا بروتينية (خاصة الاورنيتين و GABA). حددت كذلك الأنشطة المحللة لأنواع بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة و المنتمية ل 24 سلالة، وذلك باستخدام عتبة-API ZYM.

سمحت هذه الدراسة باستكشاف العملية الجديدة للتخمير مع تحديد تنوع واسع لبكتيريا حمض اللاكتيك المستعمرة وتفاعلاتها مع مصفوفة القمح المخمرة .

الكلمات المفتاحية: التخمر- قمح صلب - الخل - النظام البيئي - بكتيريا حمض اللاكتيك - التنوع- تفاعل- Microbiote - مصفوفة.

Activités scientifiques réalisées au cours de ce travail

Le présent travail a été réalisé dans le cadre d'un **projet de coopération scientifique inter-universitaire** (AUF/PCSI 2010-2012), avec les partenaires de l'Unité de Recherche de Mycotoxicologie (UPSP-Ecole Vétérinaire de Toulouse-France) et du programme national exceptionnel (PNE) avec les partenaires de l'Unité Mixte de Recherche Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (CIRM BIA UMR1253 STLO, Agro- campus Ouest, Rennes, France).

Publication :

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

Communications:

Merabti R., Bekhouche, F., Chuat, V., Madec, M.-N., Maillard, M.-B., Thierry, A., Valence, F. (2014). *Lemzeiet*, a traditional algerian fermented food: first characterization of lactic acid bacteria flora. Presented at the 24 International ICFMH conference, Food Micro 2014, Nantes, FRANCE (01-04 September 2014).

Bekhouche F., **Merabti R** (2014). Activities of lactic acid bacteria populations and fungi flora in fermented wheat. Presented at the third edition of the International Conference on Antimicrobial Research-ICAR2014, Madrid, SPAIN (01-03 October 2014).

Merabti R., Bekhouche F., Bailly S., Bailly J.D (2013). *Suivi de la flore microbienne du blé fermenté destiné à la fabrication du couscous LEMZEÏET*. 4th Symposium on Veterinary Sciences, Toulouse, France (11-12 April 2013).

Merabti R., Bekhouche F., Bailly S., Bailly J.D (2012). Qualité sanitaire et nutritionnelle du blé fermenté destiné à la fabrication du couscous *lemzeïet*. Présentée à la deuxième édition du congrès international : "Biotechnologie microbienne au service du développement". MICROBIOD 2, Marrakech, MAROC (02-04 Octobre 2012).

Thèse de Doctorat en Sciences

Merabti Ryma

Blé dur fermenté *lemzeiet* : étude du nouveau procédé de fermentation à l'extérieur du *matmor* et caractérisation de l'écosystème (interactions du microbiote avec la matrice)

Résumé

En Algérie, le blé dur fermenté *lemzeiet* est utilisé pour la fabrication du couscous appelé aussi *lemzeiet*. Historiquement, la fermentation du blé est réalisée dans des silos souterrains appelés *matmor*. Actuellement elle est organisée à l'extérieur du *matmor* dans des ustensiles de différentes tailles et formes, selon un nouveau procédé rapide et non contrôlé. La fermentation dans le *matmor* a été progressivement abandonnée en raison de l'exode rural et l'extension des méthodes modernes de stockage du blé.

Afin de maîtriser ce nouveau procédé et dans une approche de valorisation, nous avons réalisé une enquête sur les conditions de la fermentation du blé dur pratiquée à l'extérieur du *matmor*. A la suite des résultats obtenus, deux types de fermentation du blé, avec ou sans addition initiale de vinaigre (V et E), sont reproduits à l'échelle du laboratoire dans des jerrycans en plastique de 10 litres.

Les communautés microbiennes présentes, dans les deux types d'échantillons, sont suivies et analysées par les méthodes microbiologiques culturelles classiques. Les résultats ont montré que la fermentation favorisait la disparition de la flore fongique dès les premiers mois et l'installation d'une flore lactique dominante. Cette flore dominante, issue des échantillons E et V, est caractérisée par les méthodes culture-indépendantes (PCR-TTGE) et culture-dépendantes en couplant différentes méthodes moléculaires (séquençage des gènes ARNr 16S / *pheS* / *rpoA*, PCR espèce-spécifique). 69 isolats sont identifiés appartenant à 16 espèces, représentées par 6 genres (*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, et *Streptococcus*). La TTGE a révélé des résultats similaires aux méthodes culture-dépendantes avec la prédominance d'une bande caractéristique, attribuée à l'espèce *P. pentosaceus*. Le typage des souches appartenant à *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., et *Enterococcus* spp., par la RAPD et la PFGE, a montré une importante diversité intraspécifique.

Afin d'étudier l'effet de l'activité des bactéries lactiques sur les modifications de la matrice, nous avons analysé la composition et les caractéristiques physico-chimiques du blé fermenté. Les résultats ont indiqué que la fermentation a favorisé l'augmentation de l'acidité grasse, de l'acidité titrable et la diminution du pH. Les profils des acides aminés libres et des composés volatils sont aussi évalués en utilisant, respectivement, la chromatographie d'échange de cations et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Les 40 composés aromatiques volatils et les 25 acides aminés, identifiés, ont montré l'effet marqué de la fermentation du blé comparé au blé non fermenté (utilisé comme témoin). Nos résultats ont mis en évidence l'augmentation des taux des acides aminés libres protéinogènes et non protéinogènes (notamment l'ornithine et le GABA). Les activités hydrolytiques des espèces des bactéries lactiques isolées, appartenant à 24 souches, sont également déterminées par le kit API-ZYM.

Cette étude a permis l'exploration du nouveau procédé de fermentation avec la détermination d'une large diversité des bactéries lactiques colonisatrices et de leurs interactions avec la matrice du blé fermenté.

Mots clés : Fermentation - Blé dur - Vinaigre - Ecosystème- Bactéries lactiques - Diversité - Interaction- Microbiote – Matrice.