

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ben
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2016

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Benyacoub Nesrine Imene

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Exploitation des écosystèmes microbiens laitiers

THÈME

Soutenue publiquement le 04./07/2016

DEVANT LE JURY

Présidente	Mme N. Rechidi Sidhoum	M.A.A.	U. Mostaganem
Directrice	Mme L. Belkacemi	M.A.A.	U. Mostaganem
Examinateur	Mme H. Tahlaïti	M.A.A.	U. Mostaganem

Année universitaire 2015/2016

Dédicaces

C'est avec toute de mes sentiments que je dédie ce travail a :

Tous les musulmans du monde

Mes très chères parents qui m'on quittés mais restent toujours dans mon cœur et que dieu leurs accorde sa miséricorde et leurs ouvre les portes de son paradis.

Mon frère Yacine.

Mon cher époux Hadj Allal

Ma belle famille.

Mes tantes et mes oncles.

Mes cousines : Amel ; Wafae ; Ammara.

Toute ma famille.

L'ensemble de mes amis : Malika ; Fatima Zohra ; Soumia ; Amel ; Elbatoule ; Imene.

Ainsi qu'à mes camarades de promotion : K.Fatima ; M.Fatima ; E. Amina ; M.Nour elhouda ; E.Chafia.

Tous ceux que j'aime.

Tous ceux et celles qui m'ont apporté le soutien moral ou matériel.

Tous ceux qui mon connus, aimés appréciés, encouragés de prée ou loin pendant mes études.

J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

Benyacoub Nesrine Imene

Remerciements

Je remercie le Dieu tout puissant de m'avoir donné la force, l'amour du savoir et la patience pour pouvoir faire ce modeste travail, car sans lui rien n'est possible.

Je tiens à remercier mon encadreur Mme Belkacemi pour ces précieux conseils, ainsi sa disponibilité tout au long de mon travail.

Que les membres de jury trouvent ici mes remerciements les plus vifs pour avoir accepté d'honorer, par leur jugement, ce travail.

Mes remerciements vont également aux doctorants : Melle Meghoufel Naïma ; Melle Benkrizi Nawel ; Melle Ketroussi Lila ; et Melle Homrani Mounia.

A ceux qui m'ont aidé du près ou du loin pour réaliser ce travail.

Sans oublier ma famille et mes amis pour leurs aides, leurs soutiens et leurs amours.

Enfin, je ne peux achever ce projet sans exprimer mes sincères gratitudees à tous les enseignants de ma faculté, pour leur dévouement et leur assistance tout au long de ma formation.

Merci ...

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES :

Figure 1.	la structure chimique du dextrane	29
Figure 2.	Des colonies de la souche I9 sur milieu MRS	40
Figure 3.	Des colonies de la souche I9 sur milieu PCA lait	40
Figure 4.	Observation microscopique des souches A-I7, B-I1, C-MNL, I9 grossissement ($\times 100$) après une coloration de Gram	41
Figure 5.	Cinétique d'acidification et de pH de la souche I1	42
Figure 6.	Cinétique d'acidification et de pH de la souche I7	42
Figure 7.	Cinétique d'acidification et de pH de la souche I9	43
Figure 8.	Cinétique d'acidification et de pH de la souche MNL	43
Figure 9.	La production des EPS sur milieu MSE	44
Figure 10.	Absence de pouvoir aromatisant	44
Figure 11.	Activité protéolytique sur milieu PCA lait	45
Figure 12.	Résultat des six ATB de la souche I7	47

Liste des tableaux

Liste des tableaux :

Tableau 1. La composition globale du lait de vache	15
Tableau 2. Classification des bactéries lactiques	17
Tableau 3. Les principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de <i>Leuconostoc</i>	22
Tableau 4. Teneur en <i>Leuconostoc</i> de quelques fromages français prêts à être consommés ; fabriqués à partir de lait cru	26
Tableau 5. Origine de souches utilisées	33
Tableau 6. Observation macroscopique et microscopique des souches	42
Tableau 7. Diamètre de la protéolyse	45
Tableau 8. Résultats de la production du dextrane	46
Tableau 9. Résultat des six antibiotiques sur les quatre souches	46

Liste des abréviations

Liste des abréviations

% : pourcentage

°C : Degré Celsius

Ac : *Aerococcus*

C : cytosine

CEF : Ceftufure

CO₂ : dioxyde de carbone

D° : degré dornic

DMAc : Diméthyl acétamide

DMF : Diméthyl formamide

DMSO : diméthyl sulfoxyde

En : *Enterococcus*

EPS : exopolysacharides

g : gramme

G : guanine

h : heure

H₂O₂ : hydroxyde d'hydrogène

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

l : litre

Lb : *Lactobacillus*

Lc : *Lactococcus*

Ln : *Leuconostoc*

MAR : Marbofloxacine

min : minute

ml : millilitre

mm : millimètre

MRS : Man Rogosa Sharp

Liste des abréviations

MRSm : Man Rogosa Sharp modifier

MSE : Mayeux Sandine Elliker

Na Cl : chlorure de sodium

Na OH : hydroxyde de sodium

NAL : Nalidixic

PCA : Plate Count Agar

pH : potentiel d'hydrogène

R : Résistante

S : seconde

S : Sensible

Sp : espèce non précisée

Ssp : sous espèce

St : *Streptococcus*

SUL : Sulfaméthoxazole

T° : température

TET : Tétracycline

TOB : Tobramycine

ul : microlitre

V : volume

µm : micromètre

Liste des abréviations

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة خصائص تكنولوجيا لأربع سلالات من جنس *Leuconostocs méésentéroïdes*

بعد وضع السلالات في وسط بيولوجي في درجة حرارة 30 درجة مئوية و بعد نموها، مرت السلالات باختبارات
تكنولوجية مثل الحموضة في حليب منزوع الدسم وإنتاج ديكستران وغيرها من الاختبارات أخيرا تم تقييم قابلية
المقاومة على ستة مضادات حيوية .

تشير نتائج تقييم المهارات التكنولوجية أن جميع سلالات لديها قوة محمضة جيدة لأنه بعد ست ساعات من الحضانة
في 30 درجة مئوية تنخفض قيمة الرقم الهيدروجيني إلى 6.33 وزيادة درجة الحموضة

ويبدو أيضا أن السلالات أسفرت عن إنتاج ديكستران هذا الإنتاج يختلف من سلالة واحدة إلى أخرى نلاحظ ان هذه
السلالات اظهرت حساسية تجاه المضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية درجة الحموضة ديكستران

Résumé

L'objectif de ce travail est la caractérisation des aptitudes technologiques de quatre souches appartenant au genre *Leuconostocs mésentéroïdes*.

Après une revivification sur les deux milieux MRS et PCA lait à des températures d'incubation de 30°C, les souches ont subi des tests technologiques tel que l'acidité dans le lait écrémé, le pouvoir aromatisant, texturant et protéolytique ainsi que la production du dextrane et enfin un antibiogramme a été évalué sur six antibiotiques.

Les résultats de l'évaluation des aptitudes technologiques indiquent que l'ensemble des souches ont un bon pouvoir acidifiant car après six heures d'incubation à 30°C la valeur du pH baisse jusqu'à 6.33 et l'acidité augmente à 23D°. Il apparaît également que les souches ont un pouvoir protéolytique et également un pouvoir texturant qui s'est traduit par la production de dextrane. Cette production de dextrane divergent d'une souche à l'autre avec une meilleure production par la souche I9 (0.099g). Aucune des souches testées n'a révélé un pouvoir aromatisant. Enfin, les souches I1,I7,I9 ont montré une sensibilité vis à vis des antibiotiques testés alors que la souche MNL a présenté une résistance envers tous les antibiotiques utilisés.

Mots clés : *Leuconostoc mesenteroïdes*, pouvoir acidifiant, protéolyse, dextrane.

Abstract

The objective of this work is the characterization of technological properties of four strains of the genus *Leuconostocs mésentéroïdes*.

After a revival on both media MRS and PCA milk at incubation temperatures of 30 ° C, the strains have undergone technological tests such as acidity in the skimmed milk, flavoring, texturing and proteolytic activity and dextran production. Finally, an antibiogram was evaluated on six antibiotics.

The results of the evaluation of technological skills indicate that all strains have a good acidifying power. Indeed, after six hours of incubation at 30 ° C, the pH value decreases to 6.33 and the acidity increases to reach 23D °. It also appears that the strains possess a proteolytic and also a texturing power. This later resulted in adextranproduction which differs from strain to strain with a better result recorded by the strain I9 (0.099g). None of the tested strains revealed a flavoring power. Finally, I1, I7 and I9 strains showed a sensitivity to the tested antibiotics, whereas, the MNL strain showed a resistance to all antibiotics.

Finally, these four *Leuconostoc* strains could be interesting for dairy industries.

Keywords: *Leuconostoc mesenteroïdes*, acidifying power, proteolysis, dextran.

Introduction

Les bactéries lactiques sont généralement reconnues comme non toxiques et bénéfiques pour la santé humaine. Elles possèdent les atouts technologiques essentiels pour l'obtention d'une texture des produits fermentés et transformés, comme les produits laitiers et les dérivés de matières premières agricoles. Ainsi elles améliorent la qualité finale par la production des composés aromatiques, aussi ont une autre capacité à fermenter les hydrates de carbone et de dégrader les protéines et les lipides conduisant à la synthèse d'une large gamme de composés, tels que les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et les exopolysaccharides (**Mozzi et al, 2010**).

Ces atouts se situent dans l'aptitude à l'acidification, à l'aromatisation, à la protéolyse, encore ces dernières jouent un rôle hygiénique important en abaissant le pH et en sécrétant une variété de composés inhibiteurs qui empêchent le développement de bactéries indésirables (**Zarour et al ,2012**).

Parmi les bactéries lactiques les plus utilisées en industrie laitière, les bactéries hétérofermentaires du genre *Leuconostoc*, qui produisent à partir du lactose de l'acide lactique, de l'acétate ou l'éthanol et du dioxyde de carbone. Elles interviennent aussi, directement et indirectement, dans la phase d'affinage et dans la qualité sanitaire des fromages. Certains utilisateurs les emploient comme levain pour améliorer la qualité de leurs produits (beurre, pâtes fraîches, fromages à pâte persillée), vu qu'elles sont capables de se développer dans de nombreux produits naturels simples d'origine végétale ou animale (**Mozzi et al, 2010**).

C'est dans cette optique que s'inscrit ce travail dont l'objectif est la caractérisation des aptitudes technologiques de quatre souches autochtones appartenant au genre *Leuconostoc mesenteroides* et ce à travers l'évaluation de leur aptitude à l'acidification, à l'aromatisation, à la protéolyse et à la production de dextrane.

La flore lactique :**1.1. Introduction :**

Le lait de vache est un liquide de couleur blanc mat, opaque à cause des micelles de caséinates mais il peut être parfois jaunâtre du fait de la bêta carotène. Son odeur est toujours faible et variable en fonction de l'alimentation de la femelle productrice. Il a une saveur douceâtre, faiblement sucrée, en raison de sa richesse en lactose (Alais., 1984). Il est encore définie plus précisément selon le congrès international pour la répression des fraudes alimentaires, tenu à Genève en 1908, comme suit : « le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière, bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum ».

Les constituants de cet aliment varient en fonction des facteurs génétiques, zootechniques, physiologiques et alimentaires et la composition globale du lait de vache est représentée dans le tableau suivant :

Tableau n°01 : la composition globale du lait de vache (Vignola., 2002)

CONSTITUANTS		QUANTITE (g/l)
Eau	Eau libre	842,625
	Eau liée	32,375
Glucides	Lactose	46
Matière grasse		37
Protéines	Caséine	25
	Protéines solubles (globulines, albumines)	5.5
	Substances azotées non protéiques	1.5
Sels minéraux	Acide citrique	2
	Acide phosphorique	3,3
	Acide chlorhydrique	2,7
Constituants mineurs	Vitamines, enzymes, gaz dissous, pigments, cellules diverses	Traces

1.2 Flore lactique du lait :

Le lait peut contenir de nombreuses espèces microbiennes. Pour certains microorganismes c'est le meilleur milieu de culture, pour d'autres, il n'est qu'un véhicule. En fonction de son origine, la microflore du lait se distingue en microflore indigène ou originelle et en microflore de contamination. La flore indigène est l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis. Ces germes sont principalement des microorganismes mésophiles. Ce sont les bactéries représentées essentiellement par les genres *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Lactococcus* ainsi que les levures et les moisissures. Ces derniers constituent également la flore technologique du lait.

La flore lactique est utilisée en industrie laitière, sous forme de ferment ou levain afin de fabriquer des produits laitiers fermentés. L'intérêt technologique des bactéries lactiques réside dans la production de l'acide lactique par la fermentation du lactose en faisant baisser le pH, qui provoque une déstabilisation progressive de la dispersion micellaire, ce qui rend le lait fragile aux traitements thermiques et peut entraîner sa coagulation, même à température ambiante. Lors de la fermentation, certaines bactéries lactiques produisent du gaz carbonique ainsi que divers composés qui contribuent à l'arôme des produits laitiers. Par leur production d'enzymes protéolytiques, ces derniers contribuent à l'affinage des fromages.

Les bactéries lactiques forment un groupe très hétérogène. Elles ont en commun les caractères suivants :

- gram positive
- catalase négative
- micro aérophiles ou anaérobies facultatifs
- Généralement immobile
- fermentation des sucres
- non réduction des nitrates
- peu ou pas protéolytiques dans le lait

(Pilet et al., 1979)

Parmi les bactéries lactiques ayant comme habitat le lait, nous avons le genre *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Aerococcus*(tableau 2).

Tableau n°2 : Classification des bactéries lactiques (DE Roissart et al., 1994).

FAMILLE	GENRE	PRINCIPALES ESPECES
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lb.acidophilus</i>, <i>Lb.delbrueckii</i> - <i>Lb.plantarum</i>, <i>Lb.casei</i>, <i>Lb.sakei</i> - <i>Lb.brevis</i>, <i>Lb.fermentum</i>
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>St.pyogenes</i> - <i>St.agalactiae</i> - <i>St. Dysgalactiae</i> - <i>St.bovis</i>, <i>St. equinus</i>, <i>St.</i>
	<i>Lactococcus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lc. Lactis</i> - <i>Lc. garviae</i>, - <i>Lc. plantarum</i>, - <i>Lc. Raffinolactis</i>
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>E. faecalis</i> - <i>E. faecium</i> - <i>E. durans</i> - <i>E. hirae</i> - <i>E.gallinarum</i> - <i>E.casseliflavus</i> - <i>E.malodoratus</i> - <i>E. mundtii</i>
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Ac.viridans</i>
<i>Leuconostacae</i>	<i>Leuconostoc</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Ln.mesenteroides</i> - <i>Ln pseudomesenteroides</i> - <i>Ln lactis</i>

1.3. Genre *Lactobacillus* :

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développant à une température située entre 30 et 45°C et à un pH de 5,5. Leur croissance s'arrête lorsque le pH avoisine 3,5 (Deroissart H et al., 1994). Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al, 1994). Ces dernières fermentent le lactose et d'autres sucres pour produire l'acide lactique. Elles appartiennent en effet aux ferments lactiques et à ce titre, elles interviennent en milieu industriel (Vignola C.L., 2002). Les lactobacilles sont des hôtes très répandus et généralement utiles (Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004), on les trouve aussi dans le tractus gastro-intestinal où ils participent à l'équilibre de la flore intestinale (DE Roissart et al., 1994).

1.4. Genre *Streptococcus* :

Ce sont des bactéries présentes dans le lait cru et les produits laitiers fermentés, en forme de coques ayant pour principales caractéristiques d'être Gram positif, catalase négatif ; elles sont faiblement hémolytiques, mais jamais pathogènes, leur température de croissance minimale est de 19-21°C et optimale est de 42-43°C , ordinairement elles sont très résistantes au chauffage à 60°C pendant 30 min et sont incapables de croître en présence de 4% de Na Cl et à pH 9,6. *Streptococcus thermophilus* est la seule espèce d'intérêt industriel et nutritionnel du genre *Streptococcus*. En effet, ces cellules de forme ovoïdes, se groupant en longues chaînes, sont homofermentaires et produisent l'acide lactique. Il lui est reconnu le rôle d'agent initiateur de l'acidification en laiterie industrielle. (Haddie, 1986 ; Pilet et al., 2005)

1.5. Genre *Lactococcus* :

Les *lactocoques* sont des coques à gram positifs, de 0,5 à 1 µm de diamètre. Ils présentent un groupement typique en chaînettes, immobiles, dépourvus de spores et rarement capsulés. Ils sont aéro-anaérobie facultatifs, mésophiles, avec un optimum de croissance de 37°C. Les *lactocoques* ne tolèrent pas les milieux acides et salés, ils sont incapables de croître à pH 9,6 et en présence de 6,5% de Na Cl (Simpson et al., 2004). En technologie laitière, les *lactocoques* jouent un rôle de « Bio-conservateur ». En effet, des germes comme *Lactococcus lactis* et *Lactococcus cremoris* produisent respectivement la « nisine » et la « diplococcine », qui sont des bactériocines. Ces derniers inhibent la croissance des autres germes pouvant avoir un effet néfaste sur la sécurité des produits. Il leur est également reconnu le rôle d'agent initiateur de l'acidification en laiterie. Ce rôle est reconnu à *Lactococcus lactis* pour le caillage naturel (Greau, 1975). Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq

espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactissp. lactis*, *Lc. lactissp. cremoris* et *Lc. lactissp. Hordniae* (Pot et al, 1996 ; Pot, 2008).

1.6. Genre *Enterococcus* :

Les entérocoques sont des hôtes normaux du tractus intestinal des animaux à sang chaud. Mais ils sont aussi présents sur les plantes et chez les insectes. Plusieurs espèces peuvent avoir un caractère pathogène. Ils se distinguent des autres bactéries lactiques en forme de coque par la présence d'antigène du groupe D et par leur aptitude à croître à 10 et 45°C ; Ce genre regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β . Ce sont des commensaux de l'intestin. Le genre *enterococcus* peuvent être mobiles, ils ont un métabolisme homofermentaire généralement différenciés par la fermentation de l'arabinose et le sorbitol, et produit de l'acide lactique (Tamime, 2002 ; Ho et al, 2007).

1.7. Genre *Aerococcus* :

Aerococcus viridans et *Aerococcus urinae* sont les seules espèces reconnues du genre *Aerococcus*. En effet, Il est très différent des autres genres du groupe lactique, car il se présente sous forme de sphères immobiles de 1 à 2 μ m qui ont tendance à former des amas, mais aussi des paires et des tétrades. Il est homofermentaire, peu acidifiant, Gram-positif et catalase négative ou faiblement positive, microaérophile (Deroissart et al., 1994)

1.8. Genre *Leuconostoc* :

Les bactéries du genre *Leuconostoc* sont hétérofermentaires. Leur forme est lenticulaires, ils sont soit en paires ou en chainettes, mésophiles (Mouchet , 1962). Ce genre se caractérise avec la production d'acide lactique (isomère D), de CO₂, d'éthanol, hydrolyse de l'esculine, et la formation de dextrane pour certaines espèces, la température de croissance de cette bactérie est entre 25 et 30°C, et elle a une capacité à croître à différents pH (Pilet et al., 1998 ; Ho et al, 2007).

1.9. Autres genres :

La flore lactique du lait n'est pas uniquement constituée de bactéries lactiques. On à également des bifidobactéries qui sont des hôtes normaux du tractus digestif des vertébrés leur rôle fondamental dans les écosystèmes digestifs justifie leur utilisation en technologie laitière.

Enfin, nous avons les levures et les moisissures qui participent également à l'affinage des fromages alors que d'autres entrent dans la fabrication de certains produits laitiers fermentés tels que le Kéfir et le Koumis (Guiraud et al, 1980 ; Simpson et al 2003).

2. *Leuconostoc* :

2.1 Découverte du genre *Leuconostoc* :

C'est en 1878 que le genre *Leuconostoc* a été défini par VAN THIEGHEM ; ce terme vient du mot « leuco » qui veut dire blanc et « Nostoc » qui est une algue bleue mucilagineuse. C'est à l'époque de l'examen microscopique, où la morphologie était un critère prédominant de l'identification, que les *Leuconostoc* sont apparus sous forme de chaînes, d'aspect mucilagineux, non pigmentés. C'est lors d'un accident apparus dans une usine de sucreries que les premières souches de *Leuconostoc* ont été isolées. Ces dernières ont produit du dextrane en milieu saccharosé, elles étaient sous forme de cocci en chaînes entourées d'une gaine bien distincte à l'examen microscopique; gaine qui rappelle celle des Nostocs (**Lacroix et Millette, 2011**).

En ce qui concerne le caractère hétérofermentaire des *leuconostoc*, c'est -à-dire leur capacité à produire du CO₂ à partir du glucose, celui-ci a été mis en évidence en 1918 par Evens, ensuite il fut confirmé par Huker en 1928 (**Carr et al, 2002**).

2.2. Caractéristiques générales et taxonomie :

2.2.1. Caractéristiques générales :

Les *Leuconostocs* sont des coques à Gram positif, mésophiles hétérofermentaires anaérobies facultatifs, catalase négative, disposé par paire ou en chaînes courtes, non mobiles, et non sporulés (**Garvie, 1986**). Leur température de croissance se situe entre 20 et 30°C. Elles ne sont ni hémolytiques ni pathogènes (**Guiraud, 2003**). Elles produisent de l'acide lactique qui l'un des principaux produits finaux de la fermentation du sucre, et dans beaucoup de cas, elles produisent du dextrane à partir du saccharose (**Lee et al, 2005**).

Les principaux produits de leur métabolisme des hexoses sont le D (-) lactate, l'acétate ou l'éthanol et le CO₂. A partir du citrate du lait, du diacétyle et de l'acétoïne sont formés. Leur contenu guanine et cytosine (G+C) est de l'ordre de 37% à 45% (**Devoyod et Poullain, 1988**).

La sélection pour *Leuconostoc* est facilitée par l'utilisation de la vancomycine dans le milieu de croissance, puisque toutes les espèces de *Leuconostoc* sont intrinsèquement résistantes à la vancomycine (**Ogier et al, 2008**).

Tableau n° 03 : Les principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de *Leuconostoc* (Dellaglio et al, 1994).

Espèces	Croissance dans/à :						Gaz à partir du glucose	Isomère de l'acide lactique	Production du dextrane	hydrolyse	
	NaCl 3%	NaCl 6,5%	15°C	30°C	37°C	45°C				Arginine	Esculine
<i>Ln.lactis</i>	±	-	-	-	+	-	+	D(-)	-	-	-
<i>Ln. mesenteroides</i> <i>ssp.cremoris</i>	-	-	+	+	-	-	+	D(-)	-	-	-
<i>Ln. mesenteroides.</i> <i>ssp.dextranicum</i>	±	-	+	-	+	-	+	D(-)	+	-	±
<i>Ln. mesenteroides.</i> <i>ssp.mesenteroides</i>	+	±	+	+	±	-	+	D(-)	+	-	±

+ : plus de 90% de réactions positives ; - moins de 10% de réactions positives ; ± : réactions positives faibles ou tardives

2.2.2. Taxonomie :

La découverte de nouvelles nouveaux genres tels que *Oenococcus* et *Weissella* a conduit les chercheurs à effectuer des changements taxonomiques (Collins et al, 1993 ; Dicks et al, 1995).

Les nouveaux changements de nomenclature effectués démontrent que le genre *Leuconostoc* comprend 12 espèces microbiennes :

L.mesenteroides (avec trois sous-espèces : *mesenteroides*, *dextranicum* et *cremoris*), *L.citreum*, *L.carnosum*, *L.fallax*, *L.ficulneum*, *L.gasicomitatum*, *L.gelidum*, *L.inhae*, *L.kimchii*, *L.lactis* et *L.pseudomesenteroides*, *L.palmae*, *L.holzapfelii* (Euzéby, 2010).

2.3. Les principales classifications des *Leuconostocs* :

La première classification exhaustive du genre *Leuconostoc* est celle de HUCKER et PEDERSON de 1931, qui ont étudié 80 souches d'origines très diverses (sirop de sucre, légumes en fermentation, y compris de choucroute, fenouils marinés, haricots verts, betteraves, blettes, produits fermentés à base de tomates ainsi que de lait et de produits laitiers). Ils ont classé le genre *Leuconostoc* en trois groupes :

- Le groupe 1 : ne fermentant pas le saccharose: *Leuconostoc citrovorus*.
- Le groupe 2 : fermentant le saccharose et les pentoses: *Leuconostoc mesenteroides*.

- Le groupe 3 : fermentant le saccharose mais non les pentoses : *Leuconostoc dextranicus*.
- Les groupes 2 et 3 sont des producteurs de dextrans.

En 1967, GARVIE isola du vin une nouvelle espèce de *Leuconostoc* qu'il dénomma *L. oenos*. Cet auteur a classé les *Leuconostocs* en 6 espèces: *L. mesenteroides*, *L. dextranicum*, *L. paramesenteroides*, *L. lactis*, *L. cremoris* et *L. oenos* (Garvie, 1974).

La séparation du genre *Leuconostoc* en six espèces distinctes n'était guère satisfaisante. Pour cela il ya eu d'autres différentes classifications, la plus récente classification regroupe 13 espèces: *L. mesenteroides*, *L. lactis*, *L. gelidum*, *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. pseudomesenteroides*, *L. fallax*, *L. argentinum*, *L. kimchii*, *L. gascomitatum*, *L. inhae*, *L. fructosum*, et *L. ficulnuem*. (Lee et al, 2005).

Leuconostoc. mesenteroides est la seule espèce à posséder des sous-espèces, au nombre de trois actuellement : *Leuconostoc .mesenteroide ssubsp cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides subsp dextranicum*, *Leuconostocmesenteroidessubspmesenteroides*(Lee et al., 2005).

2.4.Habitat :

Les *Leuconostoc* sont naturellement présents sur les différents végétaux comme par exemple : les choux, les olives, les concombres, et spécialement dans la betterave à sucre (Bnedimerad et al ., 2012). On les retrouve aussi dans le lait en particulier dans des laits fermentés et de nombreux fromages fabriqués à partir de lait cru de vache, brebis ou celle de la chèvre (Devoyod et Poullain, 1988).

Les espèces couramment trouvées dans le lait et les fromages fabriqués au lait cru sont les espèces *L. mesenteroides*, avec les sous-espèces *dextranicum* et *mesenteroides*, puis *L. citreum* (Cibik et al., 2000).

Leuconostoc n'est généralement pas considéré comme faisant partie de flore humaine bien que des souches ont été isolées à partir de déchets humains, des échantillons vaginaux et des échantillons de lait maternel (Hemme et Foucaud - Scheunmann, 2004).

2.5. Métabolisme des *Leuconostocs* :

2.5.1. Fermentation des hexoses :

Les bactéries lactiques ont la capacité de produire de l'acétaldéhyde et de l'éthanol à partir du glucose (**Lees et Jago, 1976**). Il existe trois voies principales pour la synthèse de l'acétaldéhyde à partir du glucose: la voie d'Embden-Meyerhof, celle d'Etner Doudoroff et la voie des hexoses mono-phosphates. Les *Leuconostoc* fermentent le glucose en utilisant la troisième voie. Ils clivent le xylose-5-phosphate en acétyl-phosphate et en glycéraldéhyde-3-phosphate par action de la phosphocétolase (**Goldberg et al., 1966**).

Les *Leuconostocs* décarboxylent indirectement le pyruvate en acétaldéhyde car ils ne possèdent pas de pyruvate décarboxylase (**Bekal et al, 2009**). La réduction de l'acétate et de l'acétaldéhyde est l'un des mécanismes principaux de la ré-oxydation de pyridine nucléotide réduite chez *L.mésenteroides* (**Galesloot, 1962**). Cette dernière possède deux alcool-déshydrogénases (**Bekal et al, 2009**).

L'acétate est le principal produit terminal du métabolisme des hexoses des souches de *Leuconostoc* par voie oxydative (**ITo et al., 1983**). Selon Lucey et Condon (1986), les cultures aérées de *Leuconostocs* croissent rapidement et produisent plus de biomasse, aux dépens du glucose et d'autres sucres, que les cultures non aérées. Ces dernières ne produisent que peu ou pas d'acétate.

2.5.2. Fermentation des citrates :

La fermentation des citrates est un phénomène très important puisqu'elle est en relation étroite avec l'activité aromatique, les *Leuconostocs* utilisent le citrate afin de former le diacétyle et d'autres composés comme l'acétate, l'acétoïne, le 2-3 butane diol et CO₂ qui joue un rôle dans la fabrication du fromage (**Kempler et McKay, 1981**).

2.5.3. Production de substances inhibitrices :

Les *Leuconostocs* ont un pouvoir inhibiteur, ils sont capables d'inhiber la croissance de certains microorganismes pathogènes tel que *S.aureus* (**Haines, 1972**).

2.5.4. Production de dextrane :

Le dextrane est un groupe de polysaccharides de haut poids moléculaire qui est synthétisé à partir du saccharose et composée par des chaînes d'unités de D-glucose (**Shah Ali et al., 2005**).

Il est produit par les espèces de *Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Acetobacter*. (**Hucker et Pederson, 1931**) ont été les premiers à avoir rapporté la production de dextrane à partir du saccharose par les *Leuconostoc*.

En technologie laitière, le dextrane comme les autres exopolysaccharides, est utilisé comme additif alimentaire, comme gélifiant par l'augmentation de la viscosité et comme stabilisant à travers le renforcement de rigidité du réseau de la caséine. En conséquence, les EPS améliorent la stabilité du produit, ils jouent un rôle important dans la fabrication des laits fermentés, les crèmes, dessert à base du lait et du lait aromatisé (**Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004**).

2.6. Rôle des *Leuconostocs* :

2.6.1. La fermentation :

Les *Leuconostocs* constituent le troisième groupe important de bactéries lactiques, grâce à son rôle essentiel dans plusieurs fermentations industrielles (**Ogier et al., 2008**) tels que les saucisses fermentées, les légumes et les produits fermentés à base de céréales et les produits laitiers comme le beurre, crème, lait frais, fromages.

Ils sont également responsables de fermentation malolactique des vins, ils interviennent aussi dans les ensilages (*Ln mesenteroides*), et les végétaux fermentés tel que les choucroutes, le cacao et le café (**Guiraud, 2003**).

2.6.2. Formation des ouvertures dans les fromages :

Ces bactéries sont considérées comme des ingrédients technologiques essentiels dans la formation des ouvertures dans le fromage bleu à pâte persillée comme le Roquefort. Ces ouvertures, dues à la production de CO₂, facilitent le développement, la croissance et l'installation correcte de *Penicillium roqueforti* (**Devoyod et Poullain, 1988**).

2.6.3. Amélioration de la texture et formation d'arôme :

Leur rôle dans la formation de l'arôme et la texture est essentiel. Les deux espèces *Ln. mesenteroides* et *Ln. lactis* métabolisent le citrate et produisent des composés aromatiques qui contribuent à la flaveur de fromage tel que diacétyl et l'acétoïne (**Vedamuthu, 1994**).

2.6.4. Acidification :

La plupart des microorganismes tels que *Leuconostoc* ont la capacité de fermenter le lactose en produisant une acidification qui entraîne la coagulation de la caséine. Cette coagulation se produit à partir d'un pH 4,6 (**Guiraud, 2003**). L'intérêt industriel du *Leuconostoc* est sa capacité de produire à partir des glucides de l'acide lactique du type (D), du CO₂, de l'éthanol et parfois même de l'acétate (**Garvie, 1986**).

La présence de *Leuconostoc* stimule également la croissance des *Lactococcus*. Ces deux raisons expliquent pourquoi on inclut les *Leuconostoc* dans les starters de fermentation pour la production de beurre ou de fromages (**Savadogo et Traore, 2011**). Les *Leuconostocs* servent peu à acidifier, mais sont complémentaires des *lactocoques* pour les caractéristiques sensorielles du produit laitier fini (ouverture et flaveur) (**Kihal et al., 2007**).

2.6.5. Gonflements du fromage :

Les *Leuconostocs* ont été impliqués dans des défauts de gonflements précoces rencontrés dans le fromage de Hollande (Galesloot, 1950), de Cheddar (Overcastet et Albrecht, 1952), dans le caillé de fromage de cottage (Sandine et al., 1959) ou de gonflements tardifs dans le fromage de Saint- Nectaire (Didienne et Devoyod, 1978)

Tableau 4 : Teneur en *Leuconostoc* de quelques fromages français prêts à être consommés ; fabriqués à partir de lait cru (Fatichenti et al., 1979) :

Fromages	Teneur en <i>Leuconostoc</i> au niveau du fromage
Charollais	10^8 - 10^9
Crottin de Chavignol	10^7 - 10^8
Reblochon	10^5 - 10^6
Pont-l'Evêque	10^8 - 10^9
Cœur de Bray	10^8
Abbaye d'Entrames	10^7
Tamié	10^4
Livarot	10^6 - 10^7
Cantal	10^7 - 10^8
Laguiole	10^6 - 10^7
Roquefort	10^6 - 10^7

2.6.6. Élimination des défauts de gout :

Grace aux *Leuconostoc*, il est possible d'éliminer le défaut dit le « vert » ou « d'acre » qu'on peut trouver généralement dans le beurre et les laits fermentée. Ce défaut est causé par une surproduction d'acétaldéhyde par rapport au diacétyl (Keenan et al., 1966).

3- Dextrane :

3.1. Généralité:

La demande progressive des polymères naturels pour diverses applications industrielles a conduit à l'exploration des exopolysaccharides microbiens (EPS) au cours de ces dernières années. Parmi les EPS il ya le dextrane qui a acquis une reconnaissance dans le monde entier en raison de sa biodégradabilité et biocompatibilité (**Patel et al 2010; Aman et al 2012; Varshosaz, 2012**).

Le dextrane est un dérivé du glucose, il a plusieurs utilisations dans le domaine médicale où il est utilisé dans le cadre des analyses sanguine, il permet de déterminer la concentration de lipoprotéines dans le sang, il entre aussi dans la composition des larmes artificielles utilisées pour traiter la sécheresse oculaire (**pierrick hordé,2016**).

3.2. Découverte du dextrane :

Le dextrane a été découvert par Louis Pasteur en 1861 comme un produit microbien dans le vin. En 1874, Scheibler a confirmé que ce polysaccharide microbien est un dextrogyre à rotation optique positive avec la formule empirique $(C_6H_{10}O_6)_n$ d'où son nom de "dextrane." Les rôles physiologiques de ce dernier dans les bactéries hôte c'est la protection contre la déshydratation, la pathogénicité, la formation de biofilm, et le quorum sensing..Le dextrane a gagné l'importance en raison de ses applications dans les aliments, les produits pharmaceutiques, biomatériaux, et chimie industrielle. Il est produit par des bactéries lactiques.

Hehrea rapporté en 1941, la première synthèse acellulaire de dextrane en utilisant le saccharose comme substrat de la dextran synthase (saccharose:1,6- α -D-glucane 6- α -glucosyltransférase), cette enzyme est l'enzyme clé qui catalyse la synthèse du dextrane à partir du saccharose. Le poids moléculaire des dextrans, le type, le degré de ramification, et la longueur des chaînes ramifiées varient généralement en fonction de la souche utilisée mais également des conditions de culture. D'après une enquête où les chercheurs ont utilisées le dextrane de la souche 96 et principalement des souches de *Leuconostoc mesenteroides*, les résultats ont démontré que la quantité de liaisons $\alpha(1-6)$ dans un dextrane peut varier de 50% **Das et al., 2014**).

3.3. Source du dextrane :

Le dextrane est un produit qui existe naturellement en petites quantités dans les aliments, tels que le sucre cristallisé raffiné, le sirop d'érable, le jus de choucroute et le miel, il est aussi considéré comme une composante de la plaque dentaire, et est synthétisé par les actions de l'enzyme bactérienne.

3.4. Structure du dextrane :

Le dextrane est un polysaccharide bactérien neutre. Cet exopolysaccharide (polysaccharide excrété à l'extérieur de la paroi cellulaire de la bactérie) est majoritairement commercialisé sous sa forme linéaire où les unités glucosidiques sont reliées par des liaisons chimiques en α -(1 \rightarrow 6). Le dosage de ces liaisons chimiques par réaction d'oxydation a été réalisé par Jeanes et al (**Jeanes et al 1954**).

Des liaisons chimiques et branchements ou ramifications existent en : α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) et α -(1 \rightarrow 4) (**Khalikova, et al 1985**). Ces différentes ramifications du dextrane dépendent de la souche bactérienne utilisée (**Sidebotham 1974**). En général, les espèces de bactéries «gram positif» sont les plus connues pour former du dextrane (**Maina, et al 2008**) en particulier, la bactérie *Leuconostoc méésentéroïdes* (souche B512-F) est fréquemment utilisée pour la production commerciale des dextrans (**Sandford, et al 1983**), notamment dans les secteurs pharmaceutique, cosmétique et alimentaire (**Slodki, et al 1986**). La structure chimique du dextrane est représentée dans la figure ci-dessous :

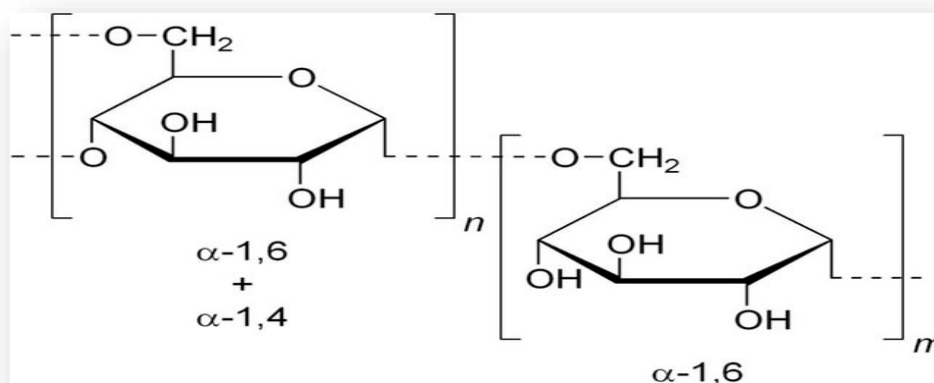


Figure 01 : la structure chimique du dextrane (**Anne, 2005**)

3.5. Propriétés physico-chimiques du dextrane :

Le dextrane est un polysaccharide très hydrophile. Tout comme de nombreux autres polysaccharides, il est soluble dans l'eau et dans quelques solvants organiques polaires tels que le diméthyl sulfoxyde (DMSO), le formamide et l'éthylène glycol. La présence de chlorure de lithium permet aussi de solubiliser le dextrane dans le N, N-Diméthyl formamide (DMF) ou le N, N-Diméthyl acétamide (DMAc). Des études par diffusion de rayons X ont démontré que le dextrane adopte en solution aqueuse et à faible concentration, une conformation de type pelote statique (**Hirata, et al 1999 ;2003**). En dehors des conditions extrêmes de pH (pH < 2), la chaîne macromoléculaire du dextrane peut être sensible à l'hydrolyse. Dans des conditions de pH basique et pour des températures supérieures à l'ambiante, la chaîne macromoléculaire du dextrane est également sensible à l'hydrolyse.

3.6. Les différentes applications du dextrane :

Le dextrane a été étudié en tant qu'ingrédient alimentaire depuis les années 1950. L'Agence Américaine des Produits Alimentaires et Médicamenteux « The US Food and Drug Administration (USFDA) » rapporte que le dextrane peut être utilisé comme additif dans les applications alimentaires destinées à l'homme et également aux animaux. Il est généralement utilisé comme gélifiant dans divers produits alimentaires (**Leemhuis et al.2013**).

Les applications commerciales du dextrane des bactéries lactiques se trouvent généralement dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

Cependant ; le Dextrane a également plusieurs applications potentielles dans la fabrication des photos films, chimie fine, cosmétique, du papier, du pétrole et des industries textiles (**Naessens et al.2005; Leemhuis et al.2013**). Il est utilisé dans les produits alimentaires suivants :

3.6.1. Boulangerie

L'incorporation du dextrane dans le pain suscite de l'intérêt pour l'amélioration des propriétés rhéologiques et de la qualité (**Galle et al.2012; Wolter et al. 2014**).

La connaissance croissante de levain fermentaire génère de nouvelles opportunités pour son utilisation dans le domaine de la boulangerie. La production de dextrane In situ par *Weissella sp.* Et *Leuconostoc mesenteroides* jouent un grand rôle dans l'amélioration de la texture, la flaveur du pain mais également dans l'amélioration de son volume et de sa durée de conservation (**Katina et al.2009; Galle et al.2012**).

Afin de réussir dans cette application et obtenir de bons résultats il faut que le dextrane a un poids moléculaire élevé et peu de liens ramifiés (**Lacaze et al. 2007**). La Commission européenne a approuvé l'utilisation du dextrane dans les produits de boulangerie, à des niveaux de 5%. L'addition de 2% de dextrane natif augmente l'absorption d'eau dans la pâte à la farine d'environ 12%. Cependant, la formation du dextrane dans le levain a été rapportée comme étant plus efficace que l'addition externe (**Brandt et al.2003**).Les dextranes de haut poids moléculaire de $(1-2) \times 10^6$ Da ont été approuvés par l'Union européenne comme ingrédients alimentaires dans les produits de boulangerie (**Naessens et al.2005**).La masse moléculaire requise a été rapportée comme étant de 2×10^6 à environ 4×10^6 Da (**Katina et al.2009**).

3.6.2. Confiseries:

Le dextrane est utilisée pour conserver la saveur, la viscosité, l'humidité, l'inhibition de la cristallisation du sucre, et comme agent gélifiant dans la gomme et gelée de bonbons en confiseries (**Maina et al.2011**).Il est également utilisé dans des boissons non alcoolisées, les boissons lactées et le givrage.

3.6.3. Glace

Il est également utilisé en tant que cryoprotecteur dans la crème glacée (**Naessens et al.2005**). Il est fade, inodore, insipide et non toxique, il a de nombreux avantages par rapport à d'autres stabilisants. Le mélange de crème glacée contenant 2 à 4% de dextrane confère des propriétés bénéfiques de viscosité (**Bhavani et Nisha 2010**).

3.6.4. Produits laitiers fermentés

La texture du yaourt peut être modifiée par la production in situ d'EPS (**Cernin 1995; Tamime et Robinson, 1999**). Les exo-polysaccharides produits par les bactéries lactiques, en particulier le dextrane, affecte positivement les propriétés rhéologiques du lait acidifié en améliorant sa viscosité, son onctuosité et en réduisant sa synérèse en raison de sa capacité de rétention d'eau (**Mende et al. 2013**)et de ce fait, ils peuvent remplacer les texturants utilisés dans le commerce comme : le xanthane, la carraghénine, la pectine, la gomme de guar, et le β -glucane.

3.6.5. Fromage

Le dextrane est un bon candidat pour la fabrication du fromage allégé pour plusieurs raisons vu qu'il a la capacité de lier l'eau et d'augmenter l'humidité de la masse non grasse ainsi il élimine les différents défauts de texture dans le fromage qui sont causé par la réduction de la graisse ou bien parfois par la forte teneur en caséine qui donne un corps caoutchouteux (**Awad et al.2005**).

3.6.6. Les pré-biotiques

Au cours des dernières années, l'utilisation de pré biotique dans les aliments fonctionnels a augmenté afin de moduler la composition du microbiote colique pour fournir des prestations de santé à l'hôte (**Saad et al.2013**).Les aliments contenant des pré-biotiques ont un rôle de protection contre le risque de plusieurs maladies comme le cancer de l'intestin, la maladie inflammatoire de l'intestin, de la diarrhée, les maladies coronariennes, l'obésité, l'ostéoporose, la cholestérolémie et le diabète de type 2. Les liaisons α - (1 \rightarrow 6) sont connues pour être résistants à l'hydrolyse par les enzymes intestinales humaines, ce qui conduit à la digestion lente de dextrane chez l'homme. Par ailleurs, les liaisons α - (1 \rightarrow 2) sont également très résistantes à l'attaque des enzymes digestives (**Remaud-Simeon et al., 2000**).Les oligosaccharides dérivés de dextrane ont également été rapportés pour augmenter la fraction des espèces de bifidobacterium dans un modèle in vitro du processus de fermentation dans le côlon humain présentant une activité pré-biotique (**Olano-Martin et al 2000**).

Un dextrane de faible poids moléculaire contenant la liaison α - (1 \rightarrow 2) ramifiés a également été signalé à agir comme pré-biotique avec effet sélectif sur le microbiote intestinal (**Sarbini et al 2013**).Ce dernier induit la croissance des bactéries bénéfiques telles que *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*ssp. ; Récemment des dextranses de *Weissellacibaria* JAG8 (**Rao et al 2014**) et *Lactobacillusplantarum* DM5 (**Das et al., 2014**) ont montré un potentiel prébiotique prometteur et la stimulation sélective de probiotiques.

3.6.7. Application cliniques:

Les dextranses de masses molaires inférieures à 7000 g/mol sont éliminés de l'organisme par le système de filtration rénale (**Wondraczek et al., 2008**). Par ailleurs, quelle que soit sa masse molaire, le dextrane est entièrement dégradé en glucose par la dextranase (α -1 glucosidase). Cette enzyme est présente dans les organes du système des phagocytes mononuclées (foie, rate et du rein) (**Tsuchiya, et al., 1952**). Le glucose est lui-même totalement hydrolysé en CO₂ et en H₂O. Le dextrane est totalement biocompatible, faiblement antigénique, biodégradable et bioéliminable. Toutes ces qualités permettent d'utiliser le dextrane pour des applications in vivo.

3.7. Modification chimique du dextrane :

Le dextrane possède trois fonctions hydroxyle qui peuvent être modifiées chimiquement par divers groupements hydrophobes ou hydrophiles selon les propriétés souhaitées. Les premiers dérivés hydrophobes du dextrane ont été préparés par estérification partielle des

groupements hydroxyle avec l'acide benzoïque et ont été utilisés pour des extractions par partage de phases impliquant des systèmes diphasiques aqueux (Lu et al., 1995).

Zhang et. Al (1998) montrent que les esters de dextrane modifiés par l'acide butyrique sont solubles dans l'eau jusqu'à un degré de substitution de 0,5 et les esters de dextrane modifiés par l'acide hexanoïque sont solubles jusqu'à un degré de substitution de 0,26. Les groupements éthyle (0,81) et butyle (0,69) carbonate révèlent une tendance identique aux composés précédents mais avec des DS plus élevés.

3.8. Effets secondaires du Dextrane :

Dextranes ont acquis le statut GRAS de la FDA, qui a été renouvelé en 2013. Toutefois, plusieurs effets secondaires sont également été associés à ce polymère. Il est impliqué dans le processus de la carie dentaire. Une bactérie pathogène du genre *Streptococcus* qui produisent du dextrane insoluble, qui favorise l'adhésion des bactéries sur les dents et provoque la formation de la plaque dentaire. Le dextrane ingéré par voie orale se transforme rapidement en glucose, et donc, il est nocif pour les patients diabétiques. Le gonflement ou effet osmotique de dextrane est également associée à une insuffisance rénale aiguë chez ces patients. Il a également été rapporté que le dextrane de poids moléculaire élevé induit des anticorps anti-dextrane, conduisant à des réactions anaphylactiques chez certains patients.

La production de dextrane a été reconnue comme une nuisance à l'industrie du sucre depuis des décennies. Puisque sa formation crée des problèmes dans l'usine de sucre parce qu'il conduit à une baisse récupération de sucre, se traduisant par une perte économique, encore il augmente la viscosité du jus, qui conduit a une mauvaise clarification. En outre, le dextrane a un impact significatif sur le marché en ayant une action sur le produit final transformé. En effet, dans certains cas, la formation de dextrane peut être responsable de la détérioration des aliments notamment des produits de salaison.

Lieu de travail :

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Sciences et Technique de Production Animales de la faculté des sciences et SNV de l'université Abdelhamid Ibn Badis, situé à Hassi Mameche de la wilaya de Mostaganem.

Objectif du travail :

L'objectif de cette étude est la caractérisation des aptitudes technologique de souches appartenant au genre *Leuconostoc*.

4.1. Origine des bactéries utilisées :

Quatre souches des bactéries lactiques appartenant au genre *Leuconostoc* ont été étudiées. L'origine, le nom et le code de ces souches sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau n° 05 : origine de souches utilisées

Souche	Genre / espèce	Code	Origine
01	<i>L.mesonteroides ssp. mesenteroides</i>	I7	Lait de vache
02	<i>L.mesonteroides ssp. mesenteroides</i>	I9	
03	<i>L. mesonteroide sssp. Dextransicum</i>	I1	
04	<i>L.mesonteroide sssp. Dextransicum</i>	MNL	Lait de chèvre

4.2. Revivification :

A partir des souches conservées en cryotubes à -18°C, une souche est pris à l'aide d'une anse de platine et mise sur le milieu PCA lait gélosé en réalisant des stries. Le même travail a été réalisé sur milieu MRS gélosé, l'incubation des boîtes s'est faite à 30°C pendant 24h.

4.3. Étude morphologique des isolats :

4.3.1. Observation macroscopique :

Cette étude nous a permis de noter le diamètre des souches, la couleur, la taille, le contour, la texture et l'opacité.

4.3.2. Test catalase :

Le but de ce test est de différencier les bactéries lactiques qui sont catalase négative, des entérobactéries qui sont catalase positive, la réaction positive se traduit par un dégagement immédiat de bulles de gaz (**Guiraud, 2003**).

La réalisation de ce test se fait comme suite :

A l'aide d'une anse de platine stérile, une colonie suspecte a été posée dans une goutte d'eau oxygénée 10V sur une lame stérile ; le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase. La catalase permet la décomposition de l'eau oxygénée selon la réaction :



4.4. Observation microscopique :

L'étude microscopique des colonies est réalisée par l'intermédiaire de la coloration de Gram, qui a permis d'examiner la forme, le mode d'association et de différencier les bactéries à Gram positif de celle à Gram négatif (**Larpen et al., 1990**).

La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit en annexe 03.

4.5. Étude de quelques aptitudes technologiques :

4.5.1. Pouvoir acidifiant :

C'est un caractère technologique essentiel des bactéries lactiques car leur aptitude à l'acidification du lait dépend de l'aptitude à la fermentation du lactose et de la résistance à l'acide développé dans le lait écrémé stérile. La mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part l'évolution du pH des différentes cultures en fonction du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité totale par la soude Dornic (**Larpen, 1997**).

L'acide lactique produit par les souches isolées est mesuré à l'aide d'un pH mètre puis titré par le NaOH 1/9 N en présence d'un indicateur de pH (la phénolphtaléine 1%).

Cette acidité est exprimée en degré Dornic (D°). Un degré Dornic correspond à l'acidité apporté par 0,1g d'acide lactique dans un litre de lait.

Chaque souche estensemencée dans un flacon à 100 ml de lait écrémé stérile puis incubés à 30°C pendant 24h.

La quantité d'acide lactique est calculée aux temps: 0 h, 1h, 2h, 4h, 6h, 24h, et 48h (**Larpen, 1997**).

L'acidité est déterminée par la formule : Acidité (°D) = V NaOH x 10 :

- VNaOH : Volume de NaOH utilisé pour titrer l'acide lactique contenu dans les 10ml de lait.

4.5.2. Pouvoir texturant :

Le test est effectué sur milieu solide MSE (**Mayeux et al., 1962**). L'ensemencement des isolats se fait par la méthode de strie, et incubées à 30°C pendant 24h à 48h. La production des exo-polysaccharides se manifeste par l'apparition de colonies larges et gluantes (**Leveau et al, 1991**).

4.5.3. Pouvoir aromatisant :

Les bactéries lactiques ont la capacité de produire des composés aromatisants au cours de leurs fermentations. Afin de réaliser ce test, 10 ml de lait écrémé stérile sont mises dans un tube ensuite et ensemencés avec une colonie et incubée à 30°C pendant 24h. Après coagulation du lait, les réactifs de Vogues-Proskauer VPI et VPII on était ajouté. La présence d'arôme est révélée par l'apparition d'un anneau rouge (**Bourgeois et Leveau, 1991**).

4.5.4. Pouvoir protéolytique:

L'activité protéolytique des bactéries est mise en évidence et comparée sur le milieu gélosé PCA additionnée de lait écrémé à 10% et autre à 20%. Des cultures jeunes ont été ensemencées en touches à l'aide d'une anse de platine. Après incubation à 30°C pendant 24 h, la protéolyse est révélée par des zones claires (**Thivierge 1999**).

4.5.5. Production de dextrane

Ce test a été réalisé comme suite : pour chaque souche, 10 ml du bouillon MRS modifié a été inoculé par la culture à tester. Après une incubation de 24h, la culture a été ajoutée à 90ml de MRSm et incubée pendant 20h ensuite centrifugée à 12.000 tour pendant 20 min.

A un volume de surnageant, deux volume de l'éthanol ont été ajouté, le tout a été incubé pendant une nuit au réfrigérateur.

Les culots ont été récupérés par centrifugation à 12.000 tours pendant 15min et resuspendus dans de l'eau distillée. Cette étape a été répétée trois fois dans le but d'éliminer les sucres.

Le mélange précipité-eau a été filtré sur un du papier filtre et le culot est récupéré à l'aide d'une micropipette et recueillis dans un verre de montre.

4.6. Résistance aux antibiotiques :

Ce test consiste à étudier la résistance des souches aux antibiotiques. Ce dernier est effectué en stries serrées sur milieu solide Mueller Hinton à l'aide d'un écouvillon imbibé dans une culture jeune (âgée de 18h). Les boîtes ont été laissées sécher à une température ambiante. Chaque boîte reçoit six disques d'antibiotiques : Ceftuofur, Tobramycine, Tetracycline, Marbofloxacycline, Nalidixic, Sulfametoxyde. Après incubation à 30°C pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (**Leroy et al., 2007**).

5.1. Étude morphologique des isolats :

5.1.1. Aspect macroscopique :

Sur les milieux MRS et PCA lait solide, les souches apparaissent comme des petites colonies brillante d'environ 1mm de diamètre, de forme lenticulaire d'un contour régulier et de couleur blanchâtre.



Figure n°02 : Des colonies de la souche I9 sur milieu MRS



Figure n°03 : Des colonies de la souche I9 sur milieu PCA lait

5.2. Aspect microscopique :

L'étude microscopique est basée sur la coloration de Gram qui a confirmé que les colonies sont Gram positif, apparaissant toutes sous forme cocci avec différents modes d'associations : diplocoques (I7 et MNL), monocoque(I9) ou en chaînette (I1) (figure 4, tableau 6).

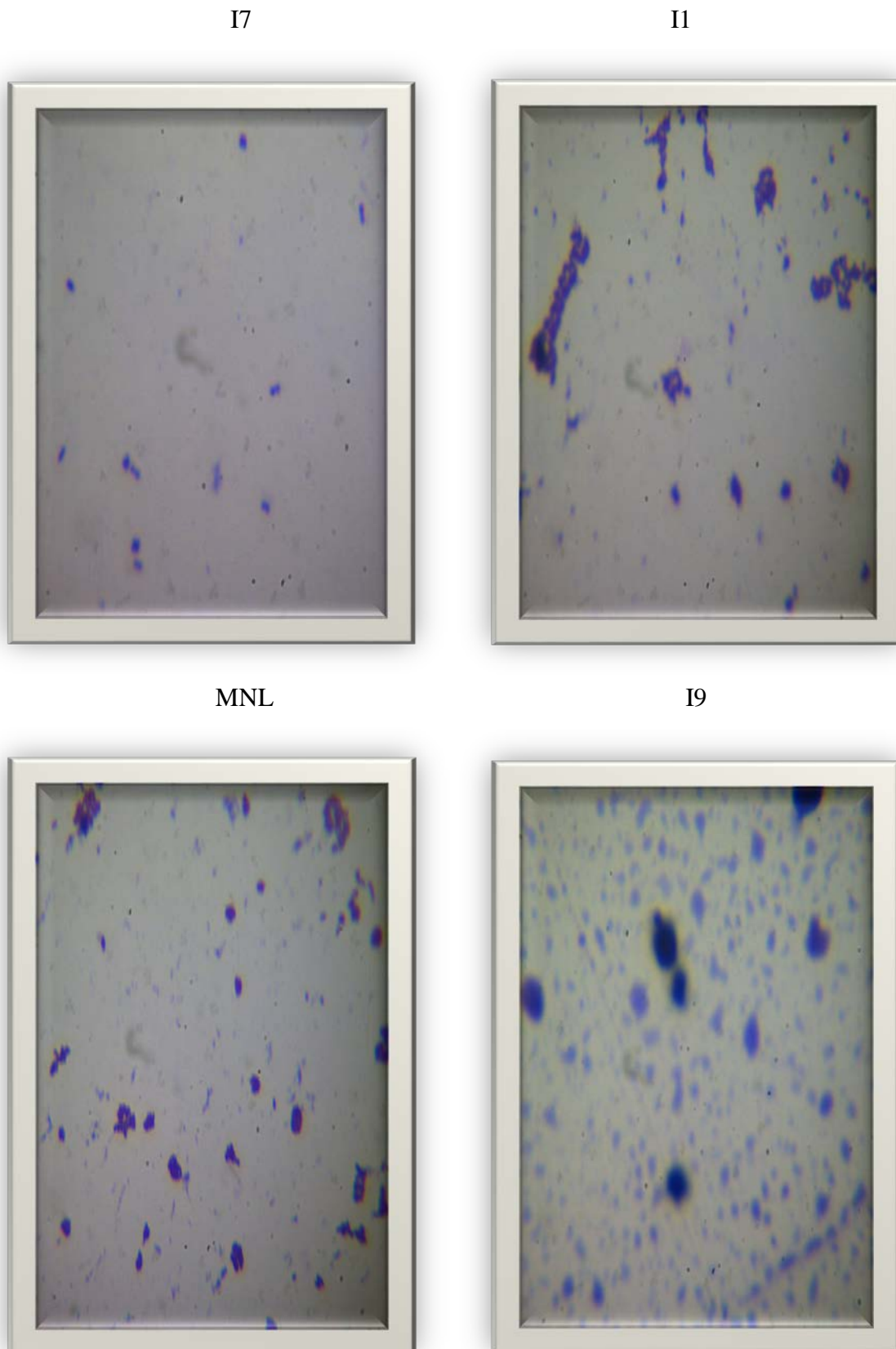


Figure n° 04: observation microscopique des souches I7, I1, MNL, I9 grossissement ($\times 100$) après une coloration de Gram.

Tableau n°06 : observation macroscopique et microscopique des souches

tests souche	Origine	Milieu de revivification		catalase	Gram	mobilité	Observation macroscopique	Observation microscopique
		MRS	PCA lait					
I1	Raib	MRS	PCA lait	-	+	-	Petite colonies brillantes	cocci Diplocoque
I7	Raib	MRS	PCA lait	-	+	-	Petite colonies brillantes	cocci Chainette
I9	Raib	MRS	PCA lait	-	+	-	Petite colonies brillantes	cocci Monocoque
MNL	Lait	MRS	PCA lait	-	+	-	Petite colonies brillantes	cocci Diplocoque

5.3. Aptitudes technologiques :

5.3.1. Pouvoir acidifiant :

Les figures 5, 6, 7 et 8 illustrent le pouvoir acidifiant des quatre souches étudiées.

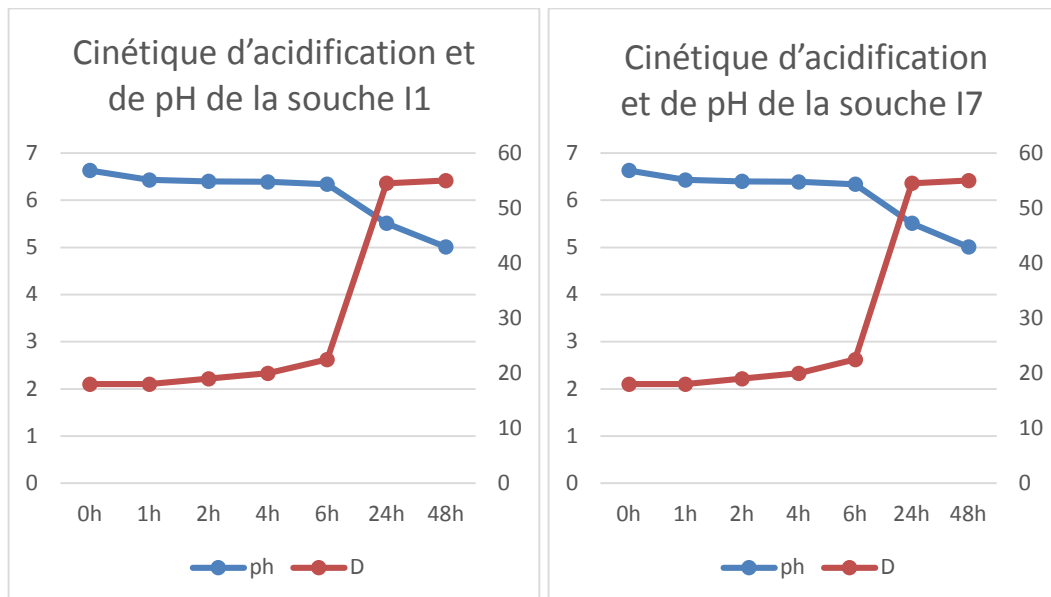


Figure n° 05: cinétique d'acidification et de pH de la souche I1

Figure n°06: cinétique d'acidification et de pH de la souche I7

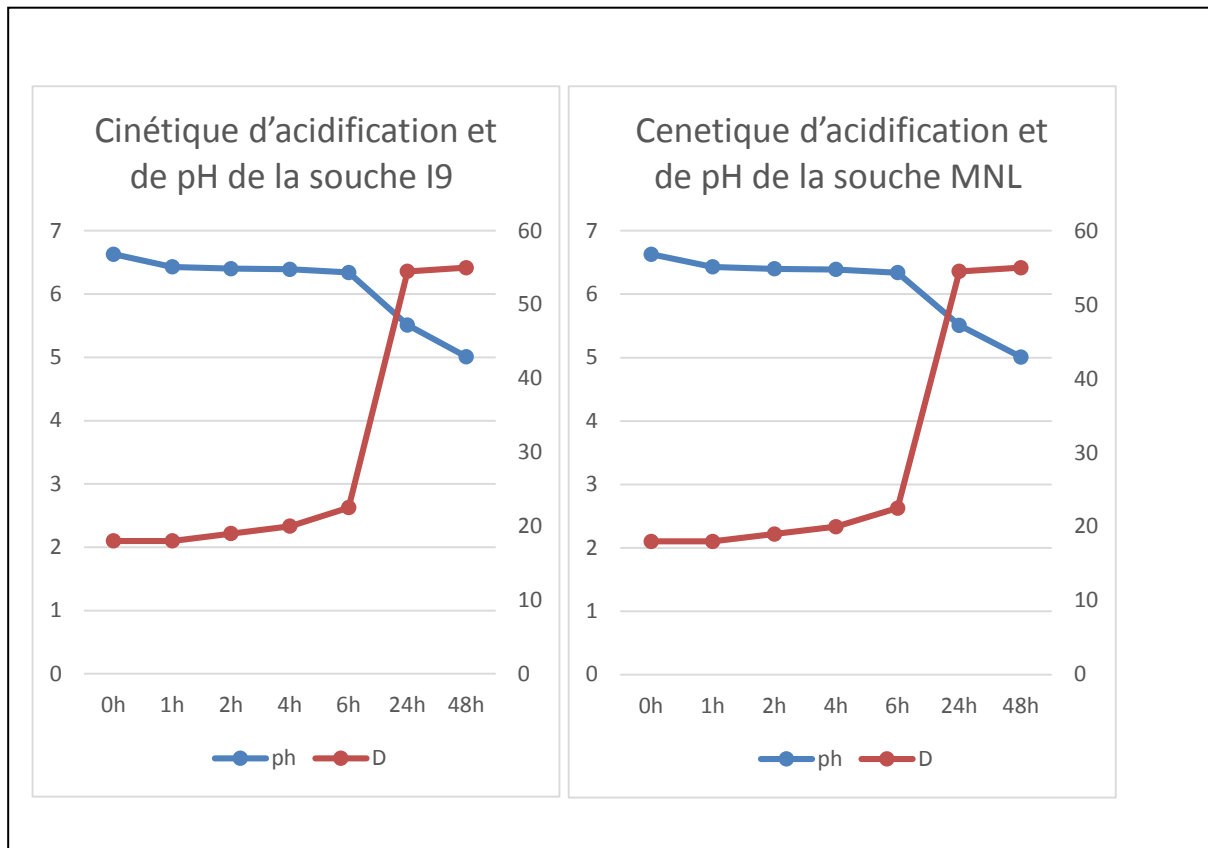


Figure n°07 : cinétique d'acidification et de pH de la souche I9

Figure n°08 : cinétique d'acidification et de pH de la souche MNL

D'après ces résultats, nous remarquons que les quatre souches présentent une production progressive en acide lactique. Cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu (Kihal et al., 2006).

Entre 0 et 6 h d'incubation les valeurs de pH ne varient pas trop et se trouvent situées entre : 6.33 et 6.63, de même l'acidité est située entre 18D° et 22.5D°

Après 6 h d'incubation, les valeurs de pH diminuent pour atteindre un pH 5.34 et pH : 6.35 et l'acidité augmente et se localise entre : 22.5 D° et 59D°.

En effet, après 48h d'incubation l'acidité domique a atteint entre : 65D° et 61D° chez les souches I7 et I9 respectivement alors qu'elle n'atteint que 59D° et 55D° pour les deux autres souches et les valeurs de pH s'abaissent entre 4.98 et 4.73 chez les souches I7 et I9 et un pH de : 5.12 et 5.01 pour les deux autres.

La cinétique d'acidification a dévoilé que les souches I1 et MNL étaient moins acidifiantes par rapport aux deux autres souches

5.3.2. Pouvoir texturant :

La production de dextrane a été remarquée pour les quatre souches présentant des résultats positifs sur la gélose hypersaccharosée (MSE), en formant des colonies à aspect plus ou moins gluant. Ce résultat est confirmé ultérieurement par l'estimation de la production de dextrane.

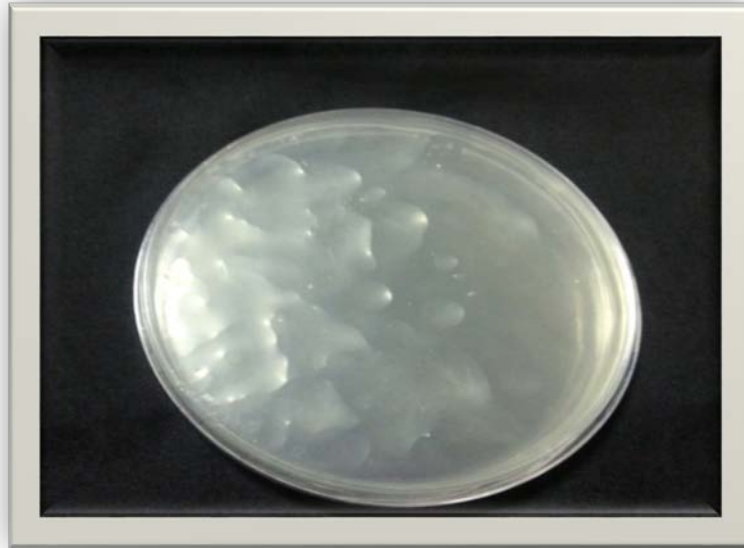


Figure n° 09: la production de dextrane sur milieu MSE

La production des EPS par les bactéries lactiques est un phénomène favorable à de nombreux processus industriels alimentaires (**Walling et al ., 2001**). Le principal intérêt de l'utilisation de bactéries lactiques productrices d'EPS lors de la production de laits fermentés est l'amélioration de la texture et la diminution de la synérèse.

5.3.3. Pouvoir aromatisant :

La production de composés d'arômes est une fonctionnalité technologique importante lors de l'élaboration des produits laitiers fermentés (**Leroy et DeVuyst ., 2004**). D'après la figure n°10, il apparaît que les quatre souches ne produisent pas d'arômes, vu l'absence d'anneau rouge. Selon **Raynaud et al (2003)**, les quatre souches ne sont pas capables de synthétiser à partir du pyruvate divers composé responsables des arômes des produits laitiers : diacétyl, acétoïne, 2,3-butanediol et α - acétolactate.

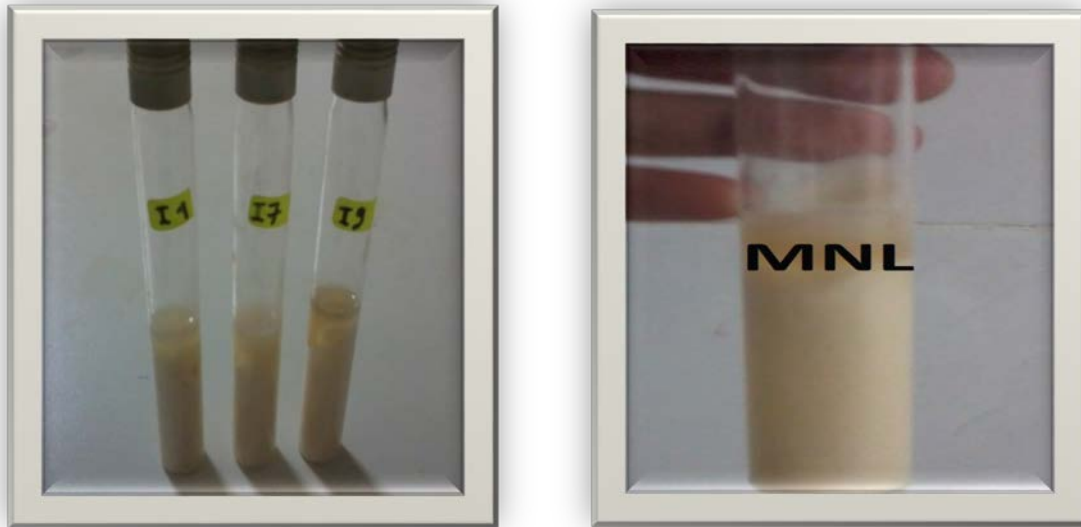


Figure n°10 : absence de pouvoir aromatisant

5.3.4. Pouvoir protéolytique:

Les résultats obtenus lors de la réalisation de ce test sont résumés dans le tableau n°7. Il en ressort du tableau que toutes les souches étudiées présentent une croissance avec une activité protéolytique traduite par l'apparition d'un halo clair.

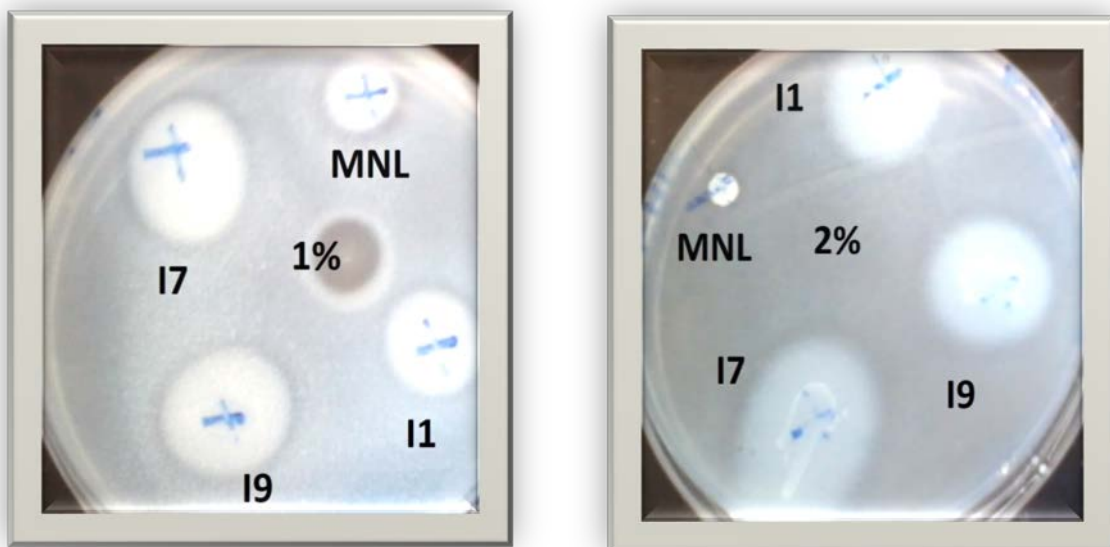


Figure n°11 : Activité protéolytique sur milieu PCA lait :

Tableau n°07 : Diamètre de la protéolyse.

Souche	Diamètre 1%	Diamètre 2%
I1	12 mm	14mm
I7	13 mm	17mm
I9	15mm	16mm
MNL	10mm	11mm

Il apparaît clairement que la souche I9 est fortement protéolytique comparativement aux autres souches avec un diamètre de 15 mm dans 1% et 16 mm de diamètre dans 2%, suivi de la souche I7 avec une zones de 13 mm dans 1% et 17 mm dans 2%. Les diamètres de protéolyse ont atteint pour la souche I1 12 mm et 14 mm respectivement sur PCA lait à 1% et 2%, et enfin MNL, jugée la moins protéolytique en raison des diamètres relativement diminués comparés aux autres souches testées (10mm et 11 mm respectivement sur PCA lait à 1% et 2%).

Selon **Vuillemard (1986)**, la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre compris entre 5 et 16 mm. Par comparaison à cette donnée, nos souches sont révélées protéolytiques dont les diamètres des zones de protéolyse étaient compris entre 10 et 16mm.

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est essentielle pour leur croissance dans le lait ainsi que pour le développement des propriétés organoleptiques des différents produits laitiers (**Savoy et Hébert, 2001 ; Hassaine et al., 2007**).

5.3.5. Production du dextrane :

Les résultats sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau n°08 : Production du dextrane

souches	I1	I7	I9	MNL
pH	4.06	4.36	4.33	4.26
Poids du dextrane sec après 24h	0.05	0.01	0.099	0.005

D'après le tableau on remarque que le poids du dextrane diffère d'une souche à une autre. Le poids le plus élevé est celui de la souche I9 (0.099g), suivi par la souche I1 avec un poids de 0.05 g. Les souches I7 et MNL ont produit le moins de dextrane (respectivement 0.01g et 0.005g).

Cette variation de chiffres revient probablement à la capacité enzymatique des souches dans la production du dextrane. A ce propos, **Zedan et al (1983)** ont rapporté que la fermentation de saccharose pour la formation de dextrane est réalisée par la dextransucrase dont la production est en continu et suit la multiplication des bactéries.

5.3.6. Résistance aux antibiotiques :

Les résultats de la résistance et la sensibilité des souches aux antibiotiques sont groupés dans le tableau n°09. Les souches présentant un diamètre de zone d'inhibition supérieur à 15mm sont considérées comme sensibles.

Tableau n°09 : Résultat d'antibiogrammes

Souches	CEF	TOB	TET	MAR	NAL	SUB
I9	S	S	S	S	R	S
I7	S	S	S	S	R	S
I1	S	S	S	S	R	S
MNL	S	R	R	R	R	R

S : Sensible ; R : Résistante(CEF : Cefotaxime ; TOB : Tobramycine ; TET : Tétracycline ;

MAR : Marbofloxacin ; NAL : Nalidixic ; SUL : Sulfaméthoxazole).

Plusieurs études ont montré la résistance naturelle d'une gamme importante de bactéries lactiques aux antibiotiques (**Botes et al., 2008**). D'après les résultats du tableau on remarque la résistance des trois souches I9, I7, I1 à l'antibiotique Nalidixic mais sont sensibles aux autres par contre la souche MNL est vraiment résistante à tous les antibiotiques sauf à la Ceftufure.

Selon **Hemme et al 2004**, cette résistance est généralement une caractéristique intrinsèque, elle est liée à la présence des pentapeptides avec D-lactate lié au C-terminal à la place de D-alanine dans la composition de peptidoglycane ce qui empêche la pénétration de l'antibiotique et par conséquent la lyse cellulaire.



Figure n°12 : résultat des six ATB de la souche I7

Conclusion :

Au terme de cette étude ayant pour objectif l'étude des aptitudes technologiques de quatre souches appartenant au genre *Leuconostocmesenteroides ssp. Mesenteroides* (I7, I9) et *Leuconostocmesenteroides ssp. dextranicum* (I1, MNL), il en ressort que ces souches présentent des caractères technologiques très importants pour l'industrie laitières. En effet, leur pouvoir acidifiant et protéolytique serait fort intéressant pour l'industrie fromagère en particulier. Leur capacité à produire le dextrans est une perspective de son utilisation dans différents domaines de l'industrie.

L'antibiogramme des souches a permis de conclure qu'elles présentent une sensibilité vers les six antibiotiques étudiés.

Enfin, les souches étudiées, en particulier les souches I7 et I9, isolées à partir du Raib de lait de vache, présentent un potentiel technologique non négligeable pour l'industrie laitière algérienne.

En perspectives, il serait estimable :

- D'étudier des cinétiques d'interaction entre les souches de *Leuconostoc* étudiées avec d'autres bactéries lactiques ;
- De mieux caractériser les activités enzymatiques de ces souches bactériennes
- D'effectuer d'autre antibiogramme afin d'évaluer leur résistance ou sensibilité à d'autres antibiotiques.

Références bibliographiques

- ALAIS CH., 1984.** Science du lait : principes des techniques laitières. IV^e édition. Paris, Ed. SEPAIC. 814 p.
- AMAN A., SIDDIQUI N. N., QADER S. A. U., 2012.** Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. *Carbohydr. Polym.* 87 910–915. 10.1016/j.carbpol.2011.08.094.
- AWAD S., HASSAN N., MUTHUKUMARAPPAN K., 2005.** Application of exopolysaccharide-producing cultures in reduced fat cheddar cheese: Texture and melting properties. *J Dairy Sci* 88:4204-4213.
- BEKAL S., BELGUESMIA Y., DRIDER D., PREVOST H., 2009.** Métabolisme des bactéries lactiques. Le citrate in : Drider D et Prévost H. Bactéries lactiques. Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles ; Métabolisme des bactéries lactiques. 52 p. Ed ECONOMICA 49, rue Héricart, Paris.
- BENDIMERADE , N. , KIHAL, M . , BERTHIER ,F.,2012.** Isolation , identification and technological characterization of wild leuconostoc and lactococci for traditional raib type milk fermentation. *Dairy science and technology.* 92 :249-264.
- BHAVANI A.L AND NISHA J., 2010.** Dextran - the polysaccharide with versatile uses. *International journal of pharma and bio sciences.* Vol.1/issue-4, issn 0975-6299.
- BOTES M., LOOS B., VAN REENEN C.A., DICKS L.M., 2008.** Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii*ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. *Archives Microbiology* 190 (5):573-584.
- BOURGEOIS C.M AND LEVEAU JY., 1991.** Technique d'analyse et contrôle dans les industries agroalimentaires. Contrôle microbiologique. Tome 3,2^{ème} édition, Paris, imprimé en France, Technique et documentation. Lavoisier: 454.
- BRANDT K., BULFONE-PAUS S., FOSTER D.C., RÜCKERT R., 2003.** Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* 102:4090-4098.
- Carbon Dioxide Production by *Leuconostoc mesenteroides*** Grown in Single and Mixed Culture with *Lactococcus lactis* in Skimmed Milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 2 (2): 62-68. ENSBANA, 1 Esplanade Erasme.France.
- CARR FJ., CHILL D., MAIDA N., 2002.** The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28(4): 281–370.

- CERNING J., 1995.** Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait* 75, 463–472
- CIBIK R., LEPAGE E., TAILLIEZ P., 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(2):267-78.
- COLLINS N. L., DUNKEL-SCHETTER C., LOBEL M., SCRIMSHAW S. C. M., 1993.** Social Support in Pregnancy: Psychosocial Correlates of Birth Outcomes and Postpartum Depression. *Journal of Personality and Social Psychology*, Vol. 65, No. 6, 1243-1258. *Dairy Sciences* 77: 2725-2737.
- D. Hemme, C. Foucaud-Scheunemann.** *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy* . (2004) 467–494.
- DAS A., GAJENDRA S., FALENTA K., OUDIN M.J., PESCHARD P., FENG S., WU B., MARSHALL C.J., DOHERTY P., GUO W., LALLI G., 2014.** RalA promotes a direct exocyst-Par6 interaction to regulate polarity in neuronal development. *Journal of cell science*. 127:686-699.
- DE ROISSART H AND LUQUET F.M., 1994.** « Bactéries lactiques » I & II lorica (chemin de saint georges, F-38410, France), pp 1219.
- DELLAGLIO F., DE ROISSART, H., TORRIANI S., CURK M. C., JANSSENS D., 1994.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In *Bactéries Lactiques*, pp. 25-116. Edited by H. de Roissart & F. M. Luquet. Paris: Lavoisier.
- DEVOYOD J. J., POUILLAIN F., 1988.** Les *Leuconostocs* Propriétés: leur rôle en technologie laitière. *Le Lait*. 68 : 249-280. INRA. Jouy-en-Josas, France.
- DICKS L. M., DELLAGLIO F., COLLINS M. D., 1995.** Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 395-397.
- DIDIENNE R AND DEVOYOD J.J., 1978.** Late blowing in cheese made from uncooked curd. 20th Int. Dairy Congr., Paris, Vol. 1E, 760.
- Docteur pierrick hordé.,** *sante-medecine.net* .,2016.
- EUZEBY J.P., 2010.** List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *leuconostoc*.
- FATICHEMIF., DEIANA P., FARRIS G.A., SOGGIA G., 1979.** Etudes microbiologiques sur le lait et le fromage de chèvre en Sardaigne. *Lait*, 59, 387-400.

- GALESLOOT T, 1950.** An early gas defect in cheese caused by *Betacoccus* (*Leuconostoc*) species with some remarks about the nomenclature of *Betacoccus* (*Leuconostoc*) species. *Neth. Milk Dairy* 1., 4, 274-287.
- GALESLOOTTE., 1962.** The bacteriology and biochemistry of starters and ripened cream. 16th Int. Dairy Congr., Copenhagen, D, 143-161.
- GALLE S., SCHWAB C., DAL BELLOA F., COFFEY A., GÄNZLE M.G. ARENDT E.A., 2012.** Influence of in-situ synthesized exopolysaccharides on the quality of gluten-free sorghum sourdough bread. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 155, Issue 3, Pages 105–112.
- GARVIE E. I., 1986.** Genus *Leuconostoc* van Tieghem 1878. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1071–1075. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- GARVIE E.I., 1974.** Gram-positive cocci. Genus II *Leuconostoc*. In : *Bergey's Manual*, 8th edit., the Williams and Wilkins Co., Baltimore, 510-513.
- GIRAUD J.P & ROSEC J.P., 2004.** *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. Ed. AFNOR. 298p.
- GOLDBERG M., FESSENDEN J.M., RACKER E., 1966.** Phosphoketolase. *Methods in Enzymology* 9, 5 15-520.
- GREAUME M.O.A., 1975.** Le lait : ce qu'il doit être, comment l'obtenir. Thèse : Méd. Vét. Toulouse, 90.
- GUIRAUD J.P., 2003.** *Microbiologie alimentaire*. pp 91-116. RIA. Dunod, Paris.
- GUIRAUD J AND GALZY P., 1980.** *L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires*, Collection Génie alimentaire, Edition de l'Usine, 240 pages.
- HADDIE J.M., 1986.** Other streptococci. In : *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.W. et Baltimore W.). 1 : 1070.
- HAINES W.C., 1972.** Growth and production of enterotoxin by *Staphylococcus aureus* grown in association with selected lactic acid bacteria. *Diss. Abstr. /nt.*, B33, 2171-2172.
- HEMME D AND FOUCAUD-SCHEUNEMANN C., 2004.** *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int. Dairy J.*, 14: 467-494.
- HIRATA K.1., DICHEK H.L., CIOFFI J.A., CHOI S.Y., LEEPER N.J., QUINTANA L., KRONMAL G.S., COOPER A.D., QUERTERMOUS T., 1999.**

Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J Biol Chem.* 14;274(20):14170-5.

HIRATA T., IWAMOTO-KIHARA A., SUN-WADA G.H., OKAJIMA T., WADA Y., FUTAI M., 2003. Subunit rotation of vacuolar-type proton pumping ATPase: relative rotation of the G and C subunits. *J Biol Chem*278(26):23714-9.

HO R, RACHEK LI, XU Y, KELLEY MR, LEDOUX SP, WILSON GL., 2007. Yeast apurinic/aprimidinic endonuclease Apn1 protects mammalian neuronal cell line from oxidative stress. *J Neurochem*102(1):13-24.

HUCKER G. J AND PEDERSON C. S., 1931. A study of the physiology and classification of the genus *Leuconostoc*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk.* II 6 3 :59 - 96. *Abt.* 85:65-114.

ITO H., FUKUDA Y., MURATA K., KIMURA A., 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* Jan;153(1):163-8.

JEANES A., HAYNES W.C., WILHAM C.A., RANKIN J.C., MELVIN E.H., AUSTIN M.J., CLUSKEY J.E., FISHER B.E., TSUCHIYA J.H., RIST C.E., 1954. Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 76: 5041-5052.

KATINA K.1., MAINA N.H., JUVONEN R., FLANDER L., JOHANSSON L., VIRKKI L., TENKANEN M., LAITILA A., 2009. In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. *Food Microbiol.*; 26(7):734-43.

KEENAN T.W., LINDSAY R.C., DAY E.A., 1966. Acetaldehyde utilization by *leuconostocs*. *Appl. Microbiol.*, 14, 802-806.

KEMPLER G. M AND MC KAY L. L., 1981. Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* ssp, *diacetylactis*. *J. Dairy Sei.*, 64, 1527- 1539.

KHALID N.M AND MARTH E.H., 1990. Purification and Partial Characterization of a Prolyl-Dipeptidyl Aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32.

KHALIKOVA E., SUSI P., KORPELA T., 1985. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes 137, P. 1-12. 35 R. M.

KIHAL M., HENNI J H ,... prevost et diviés. C (2006).A new manometric methode for measerung carbon doxid production by dairy starter culture : a cause of *leuconostoc mesenteroide* *Int African J bitechnol* Vol 5(4) : 378-383

KIHAL M., PREVOST H., HENNI D.E., BENMECHERNE Z., DIVIES C., 2007.

- KRALJ S., DIJKSTRA B.W., DIJKHUIZEN L., 2013.** Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *J Biotechnol.* 2013;163:250–272. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.06.037.
- LACAZE G., WICK M., CAPPELLE S., 2007.** Emerging fermentation technologies: Development of novel sourdoughs. *Food Microbiology.* Volume 24, Issue 2 Pages 155–160.
- LACROIX M AND MILLETTE M., 2011.** Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria.
- LARPENT J.P AND LARPENT-GOURGAND M., 1990.** *Mémento technique de Microbiologie*, Lavoisier, Paris.
- LARPENT J.P., 1997.** *Microbiologie alimentaire: Techniques de laboratoire.* Tec & Doc.
- LECLERC H., GAILLARD F L. ET SIMONET M., 1994.** Les grands groupes de bactéries. In : *Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien.* DOIN. Paris. 445
- LEE S., HOON CHOI J., SOON KIM Y., HANG KYUNG K., 2005.** Characterization of New *Leuconostoc* Species Isolated From Fresh Garlic. *Fppd Sci. Biotechnol.* Vol. 14. No. 3. pp.416-419. Sejong university. Korea.
- LEEMHUIS H., PIJNING T., DOBRUCHOWSKA J.M., VAN LEEUWEN S.S., LEES G. J. and JAGO G. R., 1976.** Acetaldehyde : an intermediate in the formation of ethanol from glucose by lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.*, 43, 63-73.
- Leroy F. et De Vuyst L., 2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Tre.FoodSci. Technol.* 15 : 67-78.
- LEVEAU J.Y., BOIUX M., DE ROISSART H.B., 1991.** La flore lactique: technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires (2 nd Edn), *Technology & Document*, Lavoisier. Paris 3: 2-40.
- LU Q., ZHANG X., ALMAULA N., MATHEWS C.K., INOUYE M., 1995.** The gene for nucleoside diphosphate kinase functions as a mutator gene in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* 254:337-341.
- LUBIN J.W., ARMSTRONG G.S., TUCEY T.M., LUNDBLAD V., WUTTKE D.S., 2014.** Structure of Est3 reveals a bimodal surface with differential roles in telomere replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(1):214-8.

- MAINA NH., TENKANEN M., MAAHEIMO H., JUVONEN R., VIRKKI L., 2008.** NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*. *Carbohydr Res* 343: 1446–1455.
- MAYEUX J. V., SANDINE W. E., ELLIKER P. R., 1962.** A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science* 45: 655-656.
- MENDE S., PETER M., BARTELS K., ROHM H., JAROS D., 2013.** Addition of purified exopolysaccharide isolates from *S. thermophilus* to milk and their impact on the rheology of acid gels. *Food Hydrocolloids* 32 178-185.
- MOUCHET F., 1962.** Essai sur le dénombrement des bactéries indologènes et coiiiformes dans le lait pasteurisé conditionné. Th. Med. Vét., Lyon, n°40, 75p.
- MOZZI F., RAYA R. R. ET VIGNOLO G. M., 2010.** *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*, Wiley-Blackwell Publishing, USA. 393 p.
- NAESSENS J., KITANI H., YAGI Y., SEKIKAWA K., IRAQQI F., 2005.** TNF- α mediates the development of anaemia in a murine *Trypanosoma brucei* rhodesiense infection, but not the anaemia associated with a murine *T. congolense* infection, *Clinical and Experimental Immunology* 139(3): (March 2005), 403-410, PMID: PMC 180 9320.
- OGIER J. C., CASALTA E., FARROKH C., SAÏHI A., 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126 286–290.
- OLANO-MARTIN E., MOUNTZOURIS K.C., GIBSON G.R., RASTALL R.A., 2000.** Continuous production of pectic oligosaccharides in an enzyme membrane reactor. *J Food Sci.* 2001;66:966–971.
- OVERCAST W.W AND ALBRECHT T.W., 1952.** Gas production in cheddar cheese caused by *Leuconostoc citrovorum*. *J. Dairy Sei.*, 35, 554-558.
- PATEL S., KASOJU N., BORA U., GOYAL A., 2010.** Structural analysis and biomedical applications of dextran produced by a new isolate *Pediococcus pentosaceus* screened from biodiversity hotspot Assam. *Bioresour. Technol.*, 101, 6852-6855.
- PILET CH., BOURDON J.L., TOMA B., MARCHAL N., BALBASTRE C., 1979.** *Bactériologie médicale et vétérinaire*. 2ème édition. A. Oubrè & R. Buttiaux (eds.). DOIN éditeurs. Paris. 438p.

- PILET M.F., MAGRAS C., FEDERIGHI M., 2005.** Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.
- PILET M.F., MAGRAS C., FEDERIGHI M., 1998.** Bactéries lactiques. In : Manuel de bactériologie alimentaire (Sutra L., Federighi M., Jouve J.L.). Polytechnica. Paris. 235-260.
- POT B., DEVRIESE L.A., URSI D., VANDAMME P., HAESEBROUCK F., KERSTERS K., 1996.** Phenotypic identification and differentiation of Lactococcus strains isolated from animals. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 213–222.
- POT B., 2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria, In bactéries lactiques. De la génétique aux ferments, (G Corrieu and F.M. Luquet), Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 1-106
- Raynaud S., Perrin R., Cocaign-Bousquet M. et Loubière P., 2003.** Metabolic and
- REMAUD M., PAUL F., MONSAN P., 2000.** Characterization of α -1,3 branched oligosaccharides synthesized by acceptor reaction with the extracellular glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-742. *J Carbohydr Chem.* 1992;11:359–378.
- SAAD N., DELATTRE C., URDACI M., SCHMITTER JM., BRESSOLLIER P., 2013.** An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Sci. Technol;* 50: 1-16.
- SANDFORD P. A., BAIRD J. K., 1983.** Industrial Utilization of Polysaccharides in The. *Polysaccharides*, G. O.Aspinall ed., Academic Press, 2, p 474.
- SANDINE W.E., ELLIKER P.R., ANDERSON A.W., 1959.** Taxonomie study of high carbon dioxide producing lactic acid streptococci isolated from mixed strain starter cultures. *J. Dairy Sei.*, 42, 799-808.
- SARBINI S.R., KOLIDA S., NAEYE T., EINERHAND A.W., GIBSON G.R., RASTALL R.A., 2013.** The prebiotic effect of α -1, 2 branched, low molecular weight dextran in the batch and continuous faecal fermentation system. *Journal of Functional Foods.* 5: 1938-1946.
- SAVADOGO A AND TRAORE A.S., 2011.** La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 5(5): 2057-20 International Journal of Biological and Chemical Sciences. Burkina Fa.
- Savoy de Giori G. et Hébert M., 2001.** Methods to determine proteolytic activity of lactic acid bacteria. *Methods in biotechnology*, Vol. 14: Food Microbiol. protocols. Humana Press. Totowa. 197-202.

- SHAH ALI UL Q., LUBNA I., AFSHEEN A., ERUM S., ABID A., 2005.** Production of Dextran by Newly Isolated Strains of *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-4 and PCSIR-9 [Yeni Ayrıştırılmış *Leuconostoc mesenteroid* PCSIR-4 ve PCSIR-9 Suşlarında Dekstran Üretimi]. *Türk Biyokimya Dergisi* [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem]; 31 (1); 21–26.
- SIDEBOTHAM R.L., 1974.** Dextran. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30, 371.
- SIMPSON I.A., VE´STEINSSON O., ADDERLEY P., MCGOVERN T.H., 2003.** Fuel resource utilisation in landscapes of settlement. *Journal of Archaeological Science* 30, 1401–1420.
- SIMPSON M., TAYLOR N., BARKER K., 2004.** "Environmental responsibility in SMEs: does it deliver competitive advantage?" *Business Strategy and the Environment* 13 (3) 156-171.
- SLODKI M. E., ENGLAND R. E., PLATTNER R. D., DICK W. E., 1986.** *Carbohydrate Research* 156,199-206.
- SUDIPTA DAS S., HALDAR P.K., PRAMANIK G., PANDA S.P., BERA S., 2014.** Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of *diospyros cordifolia* extract
- TAMIME A.Y., 2002.** Fermented milks: a historical food with modern applications. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 56, p. S2-S15. PMID:12556941.
- TAMIME A.Y AND ROBINSON R. K., 1999.** Background to manufacturing practice. In *Yoghurt. Science and technologie*. Paris: Perganon Press.
- THIVIERGE N., 1999.** Caractérisation de souches de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* pour le développement de ferments mésophiles à aptitudes fromagères. transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *App. Env. Microbiol.* 71(12) : 8016- 8023.
- TSUCHIYA, H. M., HELLMAN N. N., KOEPSSELL H. J., 1953.** Factors affecting molecular weight of enzymatically synthesized dextran. *Jour. Amer. Chem. Soc.* 75: 757-758.
- VARSHOSAZ J., 2012.** Dextrane conjugates in drug delivery. *Expert opin drug deliv* 9(5) : 509-523.
- VEDAMUTHU, E.R., 1994.** The dairy *Leuconostoc* - Use in dairy-products.
- VIGNOLA C.L., 2002.** Science et technologie du lait: transformation du lait. *Fondation de technologie laitière du Québec. Presses inter Polytechnique* : 600 pages.

- Vuillemard J.C., 1986.** Microbiologie des aliments. Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 3 : 1-65.
- Walling E.G., Indreau E. et Lonvaud-Funel A., 2001.** La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus damnosus* isolées du vin : mise au point de d'outils moléculaires de détection. INRA. 289-300.
- WOLTER A., HAGER A.S., ZANNINI E., CZERNY M., ARENDT E.K., 2014.** Influence of dextran-producing *Weissella cibaria* on baking properties and sensory profile of gluten-free and wheat breads. International Journal of Food Microbiology. Volume 172, Pages 83–91.
- WONDRACZEK H AND HEINZE T., 2008.** Efficient synthesis and characterization of new photoactive dextran esters showing nanosphere formation. Macromol Biosci. 7;8(7):606-14.
- ZAROOUR K., BENMECHERNENE Z., HADADJI M., MOUSSA-BOUDJMAA B., HENNI J.E., ET KIHAL M., 2012.** Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie. Nature et Technologie, Algérie.
- Zedan, H.H., El-Tayeb, O.M. and Hshen, A.A. (1983.** A quantitative study of the production of dextran from sucrose by freshly isolated strain of *Leuconostoc mesenteroides*, Egypt J. Microbiol. Special Issue, 47–65.
- ZHANG J., ROSENBERG H.F., NEI M., 1998.** Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. Proceedings of the national academy of sciences (USA) 95 : 3078-3713.

Annexe 01 :

Composition des milieux de culture :

Milieu MRS : (pH= 6.5) :

Extrait de levure	5g
Extrait de viande	10g
Glucose	20g
Peptone	10g
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0.2g
Sulfate de manganèse, 4H ₂ O	0.5g
Tween 80	1ml
Eau distillée	1000 ml
Pour obtenir un milieu solide on ajoute l'agar-agar	15g

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min (**De Man, Rogosa & sharp, 1960**)

Milieu MSE : (pH= 6.9) :

Extrait de levure	5g
Gélatine	2.5g
Tryptone	10g
Glucose	5g
Sacharose	100g
Citrate de sodium	75g
Azide de sodium	0.075g
Eau distillée	1000 ml
L'agar-agar	15g

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min (**Mayeau Sandine & Elliker 1962**)

Milieu PCA lait : (pH= 7.0) :

Tryptone	5g
Glucose	1g
Extrait de levure	2.5g
Poudre de lait	1g
Eau distillée	1000 ml
L'agar-agar	15g

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min .

Milieu Mueller-Hinton : (pH= 7.4) :

Peptone de caséine	17.5g
Viande de bœuf	5g
Amidon de maïs	1.5g
Eau distillée	1000 ml
L'agar-agar	17g

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min (**Mueller et Hinton,1941**)

Milieu MRS modifié : (pH= 6.5) :

Extrait de levure	5g
Chlorure de calcium	0.05g
Chlorure de manganèse	0.02g
Sacharose	150g
Phosphate dipotassique	15g
peptone	5g
NaCl	0.01g
Eau distillée	1000 ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min .

Annexe 02:**Réactifs :****Na OH : (N/9) :**

Na OH	4.44g
Eau distillée	1000 ml

Violet de gentiane (0.1%) :

Violet de Gentiane	1g
Ethanol (95%)	100ml
Phénol cristallisé	2g
Eau distillée	1000ml

Phénol phtaléine (1%) :

Phénol phtaléine	1g
alcool éthylique à 95°	100ml

Annexe 03:**Coloration de Gram (Singleton,1999)**

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes
- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- Rincer avec l'eau distillée pendant 5 secondes
- Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes
- Laver avec l'eau distillée pendant 10 secondes
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

Annexe 4 :
cinétique de l'acidification et de pH des quatre souches

Souches Heure	I1		I7		I9		MNL	
	pH	Acidité	pH	Acidité	pH	Acidité	pH	Acidité
0 h	6.63	18D°	6.63	18D°	6.63	18D°	6.63	18D°
1 h	6.42	18.5D°	6.43	19D°	6.41	18D°	6.43	18D°
2h	6.41	19D°	6.40	20D°	6.39	19D°	6.40	19D°
4h	6.39	22D°	6.38	21D°	6.38	22D°	6.39	20D°
6h	6.34	23D°	6.33	23D°	6.35	23D°	6.34	22.5D°
24h	5.34	28D°	5.34	58D°	5.36	59D°	5.51	54.5D°
48h	5.12	59D°	4.98	61D°	4.73	65D°	5.01	55D°

Sommaire

ملخص

TABLE DES MATIERES

Remerciements

Dédicaces

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abreviations

Introduction

Chapitre 1 : La flore lactique

1. La flore lactique	15
1.1. Introduction	15
1.2. Flore lactique du lait	16
1.3. Genre <i>Lactobacillus</i>	18
1.4. Genre <i>Streptococcus</i>	18
1.5. Genre <i>Lactococcus</i>	18
1.6. Genre <i>Enterococcus</i>	19
1.7. Genre <i>Aerococcus</i>	19
1.8. Genre <i>Leuconostoc</i>	19
1.9. Autre genre	19

Chapitre 2 : Genre *leuconostoc*

2. <i>Leuconostoc</i>	21
2.1. Découverte du genre <i>leuconostoc</i>	21
2.2. Caractéristique générales et taxonomie	21
2.2.1. Caractéristique générales	21
2.2.2. Taxonomie	22
2.3. Les principales classifications des <i>leuconostocs</i>	22
2.4. Habitat	23
2.5. Métabolismes des <i>leuconostocs</i>	24
2.5.1. Fermentation des hexoses	24
2.5.2. Fermentation des citrates	24

2.5.3. Production des substances inhibitrices	24
2.5.4. Production du dextrane	24
2.6. Rôle des <i>leuconostocs</i>	25
2.6.1. la fermentation	25
2.6.1. Formation des ouvertures dans les fromages	25
2.6.3. Amélioration de la texture et formation d'arome	25
2.6.4. Acidification	25
2.6.5. Gonflement du fromage	26
2.6.6. Elimination des défauts de gout	26

Chapitre 3 : Généralité sur le dextrane

3.1. Généralité	28
3. 2. Découverte du dextrane	28
3.3. Source du dextrane	29
3.4. Structure du dextrane	29
3.5. propriétés physico-chimiques du dextrane	30
3.6. Les différentes applications du dextrane	30
3.6.1. Boulangerie	30
3.6.2. Confiserie	31
3.6.3. Glaces	31
3.6.4. Produits laitiers fermentés	31
3.6.5. Fromage	31
3.6.6. les prés-biotiques	32
3.6.7. Applications cliniques	32
3.7. Modification chimique du dextrane	32
3.8. Effets secondaires du dextrane	33

Chapitre 4 : Matériel et méthodes

Lieu de travail	35
Objectif de travail	35
4.1. Origines des bactéries utilisées	35
4.2. Revivification	35
4.3. Etude morphologique des isolats	35
4.3.1 Observation macroscopique des isolats	36

4.3.2. Test catalase	36
4.4. Observation microscopique	36
4.5. Etude de quelque aptitude technologique	36
4.5.1. Pouvoir acidifiant	37
4.5.2. Pouvoir texturant	37
4.5.3. Pouvoir aromatisant	37
4.5.4. Pouvoir protéolytique	37
4.5.5. Production de dextrane	37
4.6. Résistance aux antibiotiques	38

Chapitre 5 : Résultats et discussion

5.1. Etude morphologique des isolats	40
5.1.1. Aspect macroscopique	40
5.2. Aspect microscopique	40
5.3. Résultat des aptitudes technologiques	42
5.3.1. Pouvoir acidifiant	42
5.3.2. Pouvoir texturant	44
5.3.3. Pouvoir aromatisant	44
5.3.4. pouvoir protéolytique	45
5.3.5. production de dextrane	47
5.4. résistance aux antibiotiques	48
Conclusion	50
Références bibliographiques	52
Annexes	62