

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université d'Oran-Es-Sénia



Faculté des Sciences
Département de Biologie

Mémoire de Magister

Option: Microbiologie fondamentale et appliquée

Présenté par

M^{elle} : HANNACHI Souad Sabrina

Thème

Inhibition des bactéries indésirables par l'activité antimicrobienne des espèces de Leuconostoc isolées du lait cru de chèvre

Devant les membres du jury :

Mr K. El. Aboudi	Professeur, Université d'Oran	Président
Mr J.E.Henni	Professeur, Université d'Oran	Examineur
Mr T. Sahraoui	Maitre de conférences, Université d'Oran	Examineur
Mr M. KIHAL	Professeur, Université d'Oran	Rapporteur
M ^{elle} Z. Benmechernene	Docteur, Université d'Oran	Co Rapporteur

2007-2008

Remerciements

Ce travail rentre dans le cadre d'un projet CNEPRU ; il a été réalisé à l'université d'Oran, Faculté des sciences au Laboratoire de Microbiologie appliquée et fondamentale sous la direction du Pr Kihal Mabrouk. Je voudrais lui exprimer ma profonde gratitude de m'avoir dirigé tout au long de ce travail avec beaucoup de patience, grâce à ces conseils, ce travail à été achevé.

J'exprime toute ma gratitude au Dr Benmechernene , co-directeur du mémoire, pour tout son aide.

Toute ma reconnaissance va au Pr Henni et Dr Sahraoui d'avoir accepté de faire partie du jury de mémoire en qualité d'examineur, et au Pr El-Aboudi d'avoir accepté d'être le président du jury, ainsi que pour l'attention et l'intérêt qu'ils ont portés à ce travail.

La rédaction de ce mémoire me donne l'occasion de remercier ainsi toutes les personnes qui ont participé et contribué au bon déroulement de ce modeste travail, toutes les personnes qui de loin ou de près m'ont aidée dans la réalisation de ce travail ; je cite quelques noms : Dr Bensalah. F, Mr Yehlalli.Y (de l'université claudes bernard France), Mr AEK et Mr Ahmed (du laboratoire pédagogique de microbiologie Université Es Senia), Mr Ait Abdeslam N., Mme Hamini..N, Karkachi S et Mme Benhammouche N...

Je remercie, plus particulièrement toute l'équipe de notre laboratoire de microbiologie appliquée et fondamentale et du laboratoire de phytopathologie

Je remercie chaleureusement ma promotion de Magister ainsi toutes personnes qui m'a soutenue.

Je témoigne toute ma reconnaissance à mon fiancé pour sa disponibilité quotidienne, ses conseils et son encouragement, toujours là dans les bons et les mauvais moments.

« Merci Maman, merci Papa, je remercie les membres de ma famille pour leur amour »

Dédicace

*Je tenais en mon âme à dédire ce fruit de toute une carrière
en signe de respect et d'amour et de reconnaissance aux êtres
les plus chers à mon cœur ; Mes parent que dieux les garde pour moi*

*Une dédicace spéciale à l'être qui m'a donné beaucoup,
sans hésitation à mon cher fiancé
Mr Kamraoui A.*

*Je dédie ainsi ce travail à ma très chère
sœur ;Lemaane ainsi à mes
frères « Zakkaria, Mehdi et Ayoub »*

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviation

Introduction générale

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I-Généralité sur le lait de chèvre	2
1. Définition	2
2. Composition du lait de chèvre	2
II. Généralité sur <i>Leuconostoc</i>	3
1. Définition des <i>Leuconostoc</i>	3
2. Habitat des leuconostocs	4
2.1. Présence dans divers environnement	4
2.2. Présence dans les produits fermentés	5
2.3. Présence en produits laitiers	5
3. Rôle clinique	6
3.1. Infection et épidémiologie	6
3.2. Résistance aux antibiotiques	6
3.3. Les activités métaboliques bénéfiques sur la santé	7
4. Caractérisation et taxonomie	7
4.1. Identification, caractérisation et biodiversité	7
4.2. Taxonomie récente	8
4.3. Comparaison des méthodes d'identification	9
5. Croissance du <i>Leuconostoc</i>	10
5.1. Culture et conservation des cultures	10
5. 1.1. Isolement et milieux de cultures	10

5. 1.2. Conservation des cultures	12
6. Resistance des <i>Leuconostoc</i> au stress	13
7. Métabolisme du <i>Leuconostoc</i>	15
7.1. Utilisation d'hydrate de carbone	15
7.1.1. Transport du sucre	16
7.1.2. Catabolisme du sucre	16
7.2. Métabolisme d'acides organiques	18
7.3. Métabolisme des composés azotés	21
7.3.1. L'exigence des acides aminés	21
7. 3.2. Le système protéolytique	22
7. 4. Métabolisme du <i>Leuconostoc</i> en présence de l'oxygène	23
7. 5. Métabolisme lipidique	24
8. La génétique des <i>Leuconostoc</i>	24
9. Intérêt biotechnologique des <i>Leuconostoc</i>	26
9. 1. Rôles dans la technologie agroalimentaire	26
9. 1.1. Les formations des ouvertures	27
9.1.2. Production d'arôme	28
9. 2. Rôles en nourritures fonctionnelles	29
9. 2. 1. L'effet probiotique du <i>Leuconostoc</i>	29
9.2. 2 Production des polysaccharides et l'effet prébiotiques	29
9. 2. 3 Production de mannitol	30
9. 2.4. Hydrolyse des α -galactosides	31
9. 2. 5. Production des vitamines	31
10. <i>Leuconostoc</i> et l'interaction microbienne	31
10.1. Réactions de Co-agrégation	32
10. 2. Croissance du <i>Leuconostoc</i> en cultures mixtes	32
10. 3. La production d'acide organique	33
10.4. Les bactériophages du <i>Leuconostoc</i>	34
10. 5. Les bactériocines produites par <i>Leuconostoc</i>	34
III-Généralité sur <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Bacillus cereus</i>	36
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	36

1.1. Caractéristiques générales	36
1.2. Toxines staphylococciques et la production de pigments	37
1.3. Le staphylocoque et les intoxications alimentaires	37
2. <i>Bacillus cereus</i>	38
2.1. Caractéristiques générales	38
1.2. Pouvoir pathogène	38

Matériel et méthode

1. Prélèvement et collection des échantillons	39
1.1. Les échantillons des laits de chèvre	39
1.1.1. Provenances des échantillons	39
1.1.2. Collecte du lait	39
1.1.3. Mesure de l'acidité Dornic et le pH des échantillons	40
1.2. Les échantillons du fromage de Roquefort	40
2. Isolement et purification des souches de <i>Leuconostoc</i>	40
2.1. Milieux de culture et d'isolement	40
2.2. Traitement des échantillons	40
2.3. Isolement et purification	41
3. Identification et caractérisation des souches	41
3.1. Test phénotypique	41
3.1.1. Examen macroscopique	41
3.1.2. Examen microscopique	42
3.1.3. La catalase	42
3.2. Test physiologique et conservation des souches	42
3.2.1. Croissance en milieu hypersalé	43
3.2.2. Croissance à pH 9,6	43

3.2.3. Croissance à différentes températures	43
3.2.4. Test de thermorésistance	43
3.2.5. Conservation des souches	43
3.3. Tests biochimiques	43
3.3.1. Production de dextrane	43
3.3.2. Recherche de l'arginine hydrolase (ADH)	43
3.3.3. L'utilisation du citrate	44
3.3.4. Recherche du type fermentaire	44
3.3.5. Métabolisme des sucres	44
4. Tests biotechnologiques	45
4.1. Mesure de la production de l'acide lactique	45
4.2. Etude du pouvoir inhibiteur	45
4.2.1. Recherche d'inhibition	46
4.2.2. La détection de la nature de l'agent inhibiteur	47
4.2.3. Cinétique de la croissance et de l'acidification en culture mixte	48

Résultat et discussion

1. Isolement et purification	49
2. Caractéristiques phénotypiques	49
3. Caractéristiques biochimiques et physiologiques	51
3.1. Type fermentaire	51
3.3. Production du dextrane	52
3.4. Production de la citratase	52
3.5. Effet du pH de NaCl et de la température d'incubation	54
3.6. Le profil fermentaire des sucres	55
4. Caractérisations biotechnologiques	57

4.1. La cinétique d'acidification	57
4.2. Effet inhibiteur des leuconostocs sur les germes pathogène	63
4.2.1. Les interactions et la recherche de la nature de l'agent inhibiteur	63
4.2.2. L'évolution du pH, l'acide lactique et la croissance en culture pure et mixte	71
4.2.2.1. L'évolution du pH et de l'acide lactique	71
4.2.2.2. Dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> en culture pure et mixte	72
Conclusion	77
Références bibliographiques	79
Annexe	

Résumé

Les bactéries lactiques du genre *Leuconostoc* contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires. Elles fermentent les glucides en acide lactique, ce qui provoque une diminution du pH favorable à la conservation des aliments. Leur pouvoir antagoniste résulte aussi d'une compétition pour les substrats et à l'élaboration de bactériocines qui inhibent les germes indésirables, par la production de ses substances ; ce genre de bactéries lactiques représentent un intérêt technologique très important.

Dans notre travail, nous avons isolé, purifié et identifié neuf souches lactiques appartiennent au genre *Leuconostoc*, à partir du lait cru de chèvre et du fromage Roquefort, par l'utilisation des méthodes microbiologiques de base, et testé leur pouvoir acidifiant et leur effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus cereus* ATCC 11778 et finalement nous avons recherché la nature des substances inhibitrices.

Bacillus cereus ATCC 11778 était résistante aux souches isolées, en revanche une inhibition importante de la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été mise en évidence par les souches SH1 et SH20. Les substances antimicrobiennes produites par les souches de *Ln mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (SH1 et SH20), sont des bactériocines. L'effet de l'acide lactique a été écarté par l'utilisation d'un tampon phosphate, la cinétique de croissance en culture pure et mixte a bien montré la sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux souches de *Leuconostoc mesenteroides* subs. *mesenteroide*, ces souches ont même présenté un pouvoir acidifiant performant.

Mot clés : *Leuconostoc*, *Staphylococcus aureus*, germes pathogènes et nuisibles, acide lactique, inhibition, bactériocine.

ملخص

تستعمل بكتيريا الحليب *Leuconostoc* كبادئات في الصناعات اللبنية و في الصناعات الغذائية، من أجل الوصول إلى نوعية جيدة للأغذية، وخاصة في مجال مشتقات الحليب.

تعمل هذه البكتيريات على إنتاج حمض اللين، مما يؤدي إلى خفض الحموضة إلى وحدة pH ملائم جدا لحفظ الأغذية وبالإضافة إلى ذلك، تقوم بإنتاج مواد أيضية مثبطة للبكتيريات الممرضة و ضرورية لتفادي التلوث الميكروبي وبالتالي تجنب التسممات الغذائية.

يهدف هذا البحث إلى عزل وتعريف مجموعة من هذه البكتيريات باستعمال طرق ميكروبية، وتقويم قدرتها على إنتاج مواد مثبطة للبكتيريات الممرضة مثل :

Bacillus cereus ATCC 11778 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

أظهرت السلالة *Bacillus cereus* ATCC 11778 مقاومة للتضاد مع كل السلالات المعزولة من حليب الماعز، ومن مادة الجبن المستوردة (Roquefort) ، في حين لوحظ تثبيط سلالة *Staphylococcus aureus* من طرف تسع سلالات مستعملة عن طريق إنتاج حمض اللين، وعندما تم التخلص من هذا الأخير بإضافة محلول منظم لتعديل الوسط انخفضت نسبة التثبيط بـ 20%، وتم الكشف عن إنتاج مادة ذات طبيعة بروتينية من طرف *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenterioide* (SH1, SH20)

كما أن دراسة حركة نمو السلالتين SH20 و *Staphylococcus aureus* في وسط الحليب، أثبتت أن العدد الخلوي لهذه الأخيرة في الوسط المختلط أظهر نقصا معتبرا، بعد 96 ساعة من التحضين بالمقارنة مع السلالة النقية.

الكلمات المفتاحية: *Leuconostoc* ، *Staphylococcus aureus*، البكتيريات الممرضة ، حمض اللين ، البكتريوسينا ت، مادة مثبطة، التضاد.

Abstract

It is known that *Leuconostoc* species contribute in food industry, more precisely milk and its diary and this is due to its production of aromatic compounds and their sugar fermentation to lactic acid, which will lead to the decrease in pH for food conservation. Moreover, its antagonistic capacity also elaborate in the inhibition of altered germs by the production of these substances, which represent an important technological interests.

The identification of *Leuconostoc* is an important step in fundamental and technological development relative to metabolic activities which help in the selection of new stable and preferment lactic acid bacteria strains for further use as starters.

The microbiological results showed that all isolates were belonging to *Leuconostoc* species. The antimicrobial effect of these species against pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus cereus* ATCC 11778 was carried out on solid media and milk.

The nature of these substances was then evaluated by several existed chemical tests.

Our results showed that two strains of *Leuconostoc mesenteroides* (SH1 and SH20) demonstrated a high inhibition activity towards only *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

The growth kinetic in both pure and mixed cultures has shown the sensitivity of *staphylococcus aureus* ATCC 25923 to the isolated *Leuconostoc mesenteroides*..

These results show that the Algerian raw goat's milk can be a source of new strains which can be used as a bio-preservative in food industry.

Key Word : *Leuconostoc*, *Staphylococcus aureus*, lactic acid, interaction, bactériocine, .pathogenic and harmful microorganisms

Liste des figures

Figure1 : <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , image au microscope à contraste de phase.	14
Figure2 : L'adhérence du <i>Leuconostoc</i> sur le moule des grés glacés.	14
Figure 3 : Métabolisme général du <i>Leuconostoc</i> .	19
Figure4 : Aspect des cultures pures des <i>Leuconostoc</i> en milieu MRS solide.	50
Figure5 : Aspect des cultures pures des <i>Leuconostoc</i> en bouillon MRS.	50
Figure 6 : Observation microscopique des cellules de <i>Leuconostoc</i> Gx1250.	50
Figure 7 : Le caractère hétérofermentaire des <i>Leuconostoc</i> .	51
Figure8 :L'aspect des colonies de <i>Leuconostoc</i> sur milieu M16BCP.	53
Figure 9 :Morphologie des colonies productrices de dextrane des espèces de <i>Leuconostoc</i> (SH1, SH4 et SH8) sur milieu MSE.	53
Figure 10 : Recherche de la citratase sur milieu KMK.	53
Figure 11 : Le profil fermentaire de la souche SH15.	56
Figure 12 : Représente la cinétique d'évolution du pH et de l'acidité Dornic chez les souches pures (SH4, SH8 et SH13) de en milieu lait.	59
Figure13 : Représente la cinétique d'évolution du pH et de l'acidité Dornic chez les souches pures (SH16, SH18 et SH3) de en milieu lait.	60
Figure14 : Représente la cinétique d'évolution du pH et de l'acidité Dornic chez les souches pures (SH20, SH15 et SH1) de en milieu lait.	61
Figure15 : Coagulation du lait par les leuconostoc après 24h d'incubation à 30°C.	62
Figure16 : .L'activité antimicrobienne diriger contre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 et <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 par les isolats de <i>Leuconostoc</i> .	68
Figure17 : la sensibilité de l'activité antimicrobienne de la souche SH20 à l'action des enzymes protéolytiques et sa résistance à la température.	69
Figure18 : l'action des enzymes protéolytiques sur l'activité antimicrobienne de la souche SH8.	69

Figure19 : Evolution de l'acidité Dornic en culture pure et mixte en fonction du temps de la souche inhibitrice SH20 et le <i>Staphylococcus aureus</i> .	73
Figure20 : Evolution du pH d'une culture pure et mixte (SH20, <i>S. aureus</i>).	74
Figure 21 : Evolution de la croissance de la souche inhibitrice SH20 et le <i>Staphylococcus aureus</i> en une culture pure et mixte en fonction du temps.	75
Figure 22 : Croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> en culture pure et mixte sur milieu Shapman.	76

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les espèces incluent dans le genre de <i>Leuconostoc</i> .	9
Le tableau 2 : Les codes utilisés pour la nomenclature des souches ayant été utilisées comme indicatrices.	39
Tableau 3 : Illustration des résultats des caractères phénotypiques capables d'orienter la classification du genre de bactéries lactiques.	54
Le tableau 4 : Indiquant le comportement de nos souches vis-à-vis les quatorze sucres utilisés.	55
Tableau 5: Illustre l'appartenance des souches isolées.	56
Tableau 6 : Résultats des interactions entre souches productrice « <i>Leuconostoc</i> » et les souches tests « <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Bacillus cereus</i> ».	58
Tableau 7: Résultats des interactions entre souches productrice « <i>Leuconostoc</i> » et les souches tests « <i>Staphylococcus aureus</i> » sur milieu tomponné et non tomponné.	58
Tableau 8: l'acidité Dornic en culture pure et mixte en fonction du temps de la souche inhibitrice SH20 et le <i>Staphylococcus aureus</i> .	67
Tableau 9: Evolution du pH d'une culture pure et mixte de la souche inhibitrice SH20 et le <i>Staphylococcus aureus</i> en fonction du temps.	67
Tableau 10: Evolution de la croissance de la souche inhibitrice SH20 et le <i>Staphylococcus aureus</i> en une culture pure et mixte en fonction du temps.	70
Tableau 11: L'acidité Dornic (°D) en culture pure et mixte en fonction du temps (h) de la souche inhibitrice SH20 et le <i>Staphylococcus aureus</i> .	73
Tableau 12: Evolution du pH d'une culture pure et mixte de la souche inhibitrice SH20 et le <i>Staphylococcus aureus</i> en fonction du temps.	74
Tableau 13: Evolution de la croissance de la souche inhibitrice SH20 et le <i>Staphylococcus aureus</i> en une culture pure et mixte en fonction du temps.	75

Abréviations

Abréviations des noms des bactéries

Lb. : *lactobacillus*

Lc. : *Lactococcus*

Ln. : *Leuconostoc*

St. : *Staphylococcus*

Autre abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

NADH: Nicotinamide adenine dinucléotide

LPT : LactoPeroxidase Thyocianate

PCR: Polymerase chain reaction

ATP : Adénosine Triphosphate

ADH : Arginine dihydrolase

pH : Potentiel d'hydrogène

Pi : Phosphate inorganique

Kpb: Kilo paire de base

Ufc : Unité formant colonie

ORF: Open reading frame

PM : Poids moléculaire

°D : Degré d'ornique

°C : Degré Celsius

µg : Microgramme

g : Gramme

h : Heure

ml: Millilitre

Introduction générale

Introduction

Les espèces appartenant au genre *Leuconostoc* sont les bactéries à Gram positif appartiennent au groupe de bactérie lactique (BL) d'importance économique, lié à de nombreux aspects positifs:

- Fermentation des produits alimentaires (choucroute, charcuterie, lait, conserves au vinaigre, etc.).
- Production de gaz (CO₂) dans les fromages présentant des ouvertures (en particulier fromages bleues).
- Production des composés aromatiques dans les produits laitiers multiples.
- Amélioration de la texture par la production du dextrane à partir du saccharose ;
- Rôles potentiels en nourritures fonctionnelles en haute valeur nutritive.
- Production de composés antimicrobiens pour la lutte contre les germes indésirables.

Les leuconostocs sont également liés à quelques aspects négatifs comprenant la détérioration dans l'industrie de canne à sucre et dans les produits alimentaires (Susiluoto *et al.*, 2003) par la formation de boue. Cependant, la bibliographie de leur utilisation en industrie laitière et en agroalimentaire, a mené à la conclusion de l'importance de ces microorganismes.

En technologie laitière, l'importance des espèces de *Leuconostoc* est largement identifiée. Elles sont souvent présentes dans des cultures starters dans l'industries laitière et également dans l'environnement de l'industrie laitière et pourraient être considérées ainsi en tant que bactérie lactique non-starter comme les lactobacilles mésophiles (Cogan, *et al.*, 2002). Leur rôle dans la formation de l'arome et la texture de certains produits laitiers est essentiel. Elles fermentent les hydrates de carbones en acide lactique, ce qui provoque une diminution du pH qui devient favorable à la conservation des aliments. Leur pouvoir antagoniste résulte aussi d'une compétition pour les substrats et sont capable d'élaboration de bactériocines, qui sont des peptides antibactériens, présentent un spectre d'activité étroit et aussi large diriger contre des espèces pathogènes qui pourraient contaminer les produits fermentés donc sont très importantes dans la conservation des aliments.

Notre mémoire porte sur l'étude des espèces du genre *Leuconostoc* isolées du lait cru de chèvre et tester leur pouvoir acidifiant et antimicrobienne à effet bactéricide vis-à-vis des bactéries pathogènes tel que *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

Synthèse bibliographique

I-Généralité sur le lait de chèvre :

1. Définition :

La chèvre fait partis des animaux domestiques, c'est un mammifère ruminant très résistant, elle survit la où d'autre animaux ont des difficultés, elle présente selon les races une grande diversité morphologique due aux origines variées. Les chèvres sont actuellement répandues dans tout le globe. En Algérie l'élevage caprin vient en seconde position (14%) après les ovins (26%), il se trouve en masse dans la zone de montagne, des hauts plateaux et des régions arides, (Benhamouche., 2005).

Les chèvres sont élevées particulièrement à raison de leurs capacités à produire le lait par lactation, une chèvre peut produire entre 400 et 700 litre de lait par an. Le lait de chèvre est caractérisé par une odeur de caprin et une couleur blanche mate (Masle et Morgan., 2001), comme le lait de vache, il offre une bonne teneur et un bon équilibre en calcium, magnésium et phosphore (Moulay., 2005).

2. Composition du lait de chèvre :

La composition du lait varie selon la race et l'espèce, les conditions d'environnement et le stade de lactation (Badis ., 2004) La composition chimique à un rôle important sur son aptitude à l'acidification par les bactéries lactiques, et sa résistance au facteur extrinsèque « température, micro-organisme de détérioration » (Masle et Morgan.,2001).

Le lait de chèvre est composé par un pourcentage élevé de micelles de caséine soluble de 10% à 20%, il est composé de 88,6% d'eau, de 3,28% de matière grasse, 4,29% de lactose, et une quantité de 3,20% de protéine, il est faible en élément minéraux : (0,64%) Calcium, (0,11%) Phosphore (0,08%) Magnésium, (0,02%), Sodium (0,04%), Potassium (0,2%) (St-Gelais *et al.*, 1992), certains de ces éléments sont important sur le plan technologique dans l'équilibre salin et le phénomène de coagulation.

Badis *et al.*, 2005, ont étudié la distribution qualitative des bactéries lactiques dans le lait de chèvre chez deux races caprin Algériens (Kabyle et Arabia) et ils ont conclu que le genre *Lactobacillus* est le plus dominant à un pourcentage de (61,18%) suivie des *Lactococcus* à (22,5%), *Streptococcus* (8,88%), *Leuconostoc* (5,92%) et (0,74%) pour les *Pediococcus* dans la population Kabile .

II. Généralité sur *Leuconostoc*

1. Définition des leuconostocs

Ce sont des microorganismes procaryotes, saprophytes, chimio-organotrophes morphologiquement extrêmement hétérogènes ne sporulent pas, elles ne sont habituellement pas mobiles, dépourvue d'oxydase et de catalase. Le métabolisme glucidique essentiellement celui du lactose donne de l'acide lactique comme produit final ce qui les a regroupées avec les bactéries lactique. Le groupe de bactéries lactiques a été défini pour la première fois par Orla Jensen en 1919. Actuellement les genres représentant les bactéries lactiques sont les suivants : *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Gamella*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Oenococcus* et *Leuconostoc* (Jay, 2000, Ghazi *et al.*, 2006).

Défini pour la 1^{ère} fois par Vantieghem (1878) et grâce aux travaux d'Orla Jensen (1919) basés sur, le type de l'acide lactique produit ainsi que la dégradation de l'arabinose et du métabolisme hétérofermentaires, confirmé par Hucker et Pederson (1931) que ce genre a été séparé des *Streptococcus*.

Leuconostoc, la famille des *Leuconostocaceae*, contient des coques ovoïdes (**Fig1**) Gram positifs pouvant être allongés ou elliptiques ce sont des cellules sphériques disposent en paire ou en chaîne elles sont caractérisées par un métabolisme hétérofermentaires en convertissant le glucose en D-lactate et éthanol ou en acide acétique par la voie de transcétolase, elles sont incapables de dégrader l'arginine ce qui les distingue des lactobacilles hétérofermentaires. (González *et al.*, 2007).

On range habituellement les leuconostocs dans les anaérobies facultatifs, mais certains les considèrent comme des anaérobies aérotolérants. Elles sont exigeantes et

présente souvent une auxotrophie pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux et les glucides (Dellaglio *et al.*, 1994).

Les leuconostocs acidifient peu le lait et certaines espèces ne le coagulent pas, ce sont des mésophiles, la température optimale de croissance se situe autour du 25°C selon l'espèce (Badis *et al.*, 2005, González *et al.*, 2007).

Les leuconostocs produisent du diacétyle de l'acétoïne, et du CO₂ à partir du citrate du lait mais plus efficacement chez *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Khedid *et al.*, 2006). Ce sont des producteurs d'arôme dans l'industrie laitière ; et leur métabolisme gazogène est responsable de la formation des ouvertures (yeux) dans les fromages bleus (Bourgeois et Larpent., 1989)

2. Habitat des leuconostocs

Selon les travaux de Ignacio Sanchez *et al.*, (2005), les espèces de *Leuconostoc* sont très répandues dans la nature, elles colonisent des écosystèmes très variés du point de vue physico-chimique tel que les végétaux (intact ou pourrissant) et les animaux (Lait, appareil digestif...).

2.1. Présence dans divers environnements

Les leuconostocs sont présentes dans divers écosystèmes, elles colonisent les végétaux qui constituent leur habitat écologique normale (Ignacio Sanchez *et al.*, 2005). Bien que leur population soit réduite (moins que 1%) comparée à celle des autres bactéries et des levures aérobies (Buckenhuskies, 1993). A partir de cet habitat d'origine, ils peuvent facilement se propager dans diverses niches comprenant les matières végétales telles que les légumes et les ensilages (Ennahar *et al.*, 2003) et les produits alimentaires fermentés.

Les bactéries du genre *Leuconostoc* peuvent être ainsi isolées à partir de la matière fécale des êtres humains et des échantillons de lait de mammite (Dal Bello, *et al.*, 2003). Elles ont été également isolées à partir de la microflore de bétail (Brashears, *et al.*, 2003), de poisson (Ringo et Gatesoupe, 1998), et des insectes (Ohkuma et Kudo, 1998; Reeson, *et al.*, 2003)

Le genre *Leuconostoc* était parmi les premiers genres du groupe de bactéries lactiques étudié pour leur rôle causal dans des pertes commerciales dans l'industrie du sucre (Day, 1992). Ces bactéries ont été également associées à la détérioration des

poissons (Lyhs, 2002) et des produits carnés (Bjorkroth *et al.*, 2000; Hamasaki, *et al.*, 2003).

2.2. Présence dans les produits fermentés :

Les bactéries lactiques appartenant au genre *Leuconostoc*, jouent un rôle important dans la fermentation des produits alimentaire variés. La source de la flore microbienne peut être la matière première quant à la production des fromages de lait cru, de la choucroute et de quelques saucisses fermentées ou des cultures de ferment référencier.

Pendant la fermentation, les produits finaux du métabolisme d'hydrate de carbone contribuent non seulement à l'acidification mais également à la saveur et à la texture du produit. La fermentation peut également augmenter la qualité alimentaire du produit en augmentant sa digestibilité, comme dans la fermentation du lait en fromage, ou en réduisant sa toxicité (Gueguen, *et al.*,1997).

2.3. Présence en produits laitiers

Les souches de *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* ou de *Ln. lactis* sont classiquement utilisés dans la production du beurre et de crème et quelques produits laitiers frais fermentés (Vedamuthu, 1994).

La présence de *Leuconostoc* est régulière dans de nombreuses variétés de fromage, sans addition des ferments starters de *Leuconostoc*, en particulier en fromages du lait cru. Cogan *et al.*,(1997) dans une étude étendue sur la flore lactique de 35 fromages européens différents comprenant 24 fromages artisanaux, ont constaté que parmi 4379, 10% de souche étaient des leuconostocs ; ce taux a été comparé aux taux des lactobacilles (mésophile, 12% et thermophile 14%) et les entérocoques 17%. Ces résultats confirment des données précédentes indiquant la présence du *Leuconostoc* dans la majorité de fromages de lait cru (Devoyod et Poullain, 1988).

De nombreuses études sont encore consacrées à l'écologie des fromages artisanaux, et l'évolution des principaux groupes microbiens pendant la fabrication. Les études éditées les cinq dernières années se sont fondées progressivement sur de nouvelles méthodes qui se base sur la biologie moléculaire (Mas *et al.*, 2002; Tavaría et Malcata, 2003).

Leuconostoc est présent dans une grande variété de lait fermenté. Ces bactéries sont également parmi les composants du grain de kéfir, légèrement comparés aux levures, intervenant dans la production de l'éthanol et de l'acétate, qui sont caractéristiques de ce produit (Robinson, *et al.*, 2002).

3. Rôle clinique :

3.1. Infection et épidémiologie :

Cliniquement, le *leuconostoc* a été décrit pour causer la bactériémie primaire, infections pulmonaires, péritonite et infection du fluide, l'endocardite, la méningite, l'ostéomyélite, l'abcès et la septicémie péritonéale. La plupart des souches appartiennent à l'espèce *Ln. mesenteroides*, l'isolement de *Ln. lactis* est rare puisque la plupart des espèces à l'exception de *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* sont capables de se développer à 37°C (Rodriguez, *et al.*, 1999; Fauchais *et al.*, 2003).

La source de ces infections demeure inconnue. La peau représente un passage possible dans les cas de co-isolement à partir de la microflore de peau et l'accès à la circulation sanguine par l'appareil gastro-intestinal a été également suggéré. Dans ces deux cas, ces germes ont été isolés chez des enfants ou de l'alimentation infantile, indiquant que ce sont des sources possibles. *Leuconostoc dentium* est l'espèce la plus répondue dans les infections dentaires (Dhodapkar et Henry, 1996).

3.2. Résistance aux antibiotiques :

La résistance du *leuconostoc* à la vancomycine est un dispositif intrinsèque général, ce caractère est lié à la présence d'un pentadepsipeptide avec un C terminal D -lactate au lieu d'un D - alanine dans le peptidoglycan (Delcour, *et al.*, 1999). Le gène responsable de la résistance à la vancomycine D-Ala-D-Ala chez *Ln. mesenteroides* a été étudié et cloné par Parc et Walsh, (1997), En revanche peu de rapports sont disponibles sur d'autres antibiotiques (Deye *et al.*, 2003). Les études étaient partielles ou bien les agents antimicrobiens examinés et les méthodes employées (dilution en bouillon, diffusion par disque..) ont différé, ainsi peu de résultats sont disponibles. Les études sur la susceptibilité antibiotique des isolats de *leuconostoc* d'origine cliniques ont prouvé qu'elles sont résistantes aux quinolones, et aux

glycopeptides. Elles sont susceptibles ou donnent une sensibilité intermédiaire aux macrolides et aux tétracyclines.

Néanmoins, l'utilisation des cultures bactériennes référenciées dans la production des produits laitiers a pu représenter un potentiel pour la diffusion des gènes codant la résistance aux agents antimicrobiens (Teale, 2002)

3.3. Les activités métaboliques bénéfiques sur la santé :

L'hydrolyse des sels biliaires dépend sur l'effet des bactéries intestinales sur les métabolites de l'être humain. Cette réaction a un effet facilitant pour l'excrétion des sels biliaires mais peut également être impliquée dans diverses maladies. Les espèces de *Ln. mesenteroides* sont incapables d'hydrolyser les sels biliaires (Tanaka, *et al.*, 1999).

Les leuconostocs produisent la D -lactate par le métabolisme d'hydrate de carbone comme les espèces appartiennent au genre de *Lactobacillus delbrueckii* (Carr *et al.*, 2002). Les êtres humains métabolisent lentement la D- lactate de sorte que la prise quotidienne recommandée ne devrait pas excéder 100 mg Kg⁻¹ (FAO, 1966). Le D- lactate ou DL - lactate ne devrait pas être employé en nourritures infantiles, sauf dans des buts thérapeutiques. La consommation normale des produits laitiers n'a pas pu mener à un excès de D - lactate.

4. Caractérisation et taxonomie

4.1. Identification, caractérisation et biodiversité :

La connaissance de l'écologie microbienne dans diverses places et des processus de fermentations pourraient également s'améliorer par l'apparition de l'identification moléculaire quoique les caractères biochimiques demeurent d'intérêt principal pour des applications technologiques. Il a été basé depuis longtemps sur des caractères phénotypiques pour isoler et caractériser les bactéries lactiques y compris les *Leuconostoc*, ainsi pour différencier entre l'espèce ou la sous-espèce (tableau 1). On peut citer : la tolérance à l'oxygène, la résistance à la salinité dans des différentes concentrations, l'aptitude à produire du gaz et des composés aromatiques, le profil fermentaire et la production des exopolysaccharides.

L'emploi de ces méthodes classiques a l'inconvénient de ne refléter qu'une quantité réduite d'information sur l'espèce et la sous-espèce de plus le choix des

critères considérés comme des critères de base se diffère d'un auteur à un autre, ce qui est une source potentielle d'instabilité. Dans les dernières décennies, les nouveaux outils moléculaires, en particulier les techniques basées sur les progrès réalisés dans la connaissance de l'ADN, ont contribué largement à clarifier la phylogénie du *Leuconostoc* et identifier de nouvelles espèces et ont donné une identification fiable et cohérente. Ces techniques sont employées seules ou combinées pour estimer la diversité moléculaire ou pour identifier les leuconostocs au niveau de l'espèce ou la sous-espèce (Gurtler et Mayall, 2001).

Les méthodes basées sur l'ADN sont extensivement employées pour la différenciation des leuconostocs (Reeson *et al.*, 2003). La séparation de l'ADN 16S ribosomal par l'électrophorèse de gel de gradient de Température Temporelle (TTGE) est d'intérêt particulier parce qu'elle permet une identification rapide de la plupart des espèces bactériennes qui colonisent les produits laitiers, y compris les *leuconostocs* (Ogier, *et al.*, 2002). La distinction entre les sous-espèces de *Ln. mesenteroides* : *dextranicum* et le *cremoris* a été confirmée en utilisant des modèles du profil protéique ou ribotypage (Perez *et al.*, 2002 ; Gazi *et al.*, 2006) tandis que Cibik *et al.* (2000) ont proposé que ces sous-espèces puissent être des *biovars*, en utilisant d'autres méthodes moléculaires.

4.2. Taxonomie récente

Seulement quatre espèces de leuconostoc ont été incluses dans le manuel de Bergey de la systématique bactériologique (Garvie, 1986), les espèces de *Ln. mesenteroides* comportant trois sous-espèces, *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*, *Ln. mesenteroides subsp dextranicum* et, *Ln. mesenteroides subsp cremoris* (Tableau1). Les deux faits principaux au sujet du leuconostoc sont la découverte du genre *Weissella* qui comporte *W. paramesenteroides* (précédemment, *Ln. Paramesenteroides*) et *Ln. oenos* comme nouveau genre, *Oenococcus oeni* (Dicks, *et al.*, 1995). Onze nouvelles espèces ont été décrites (Tableau 1): *Ln. gelidum* et *Ln. carnosum* isolés dans des produits à base de viande, *Ln. citreum* et *Ln. pseudomesenteroides* à partir des isolats cliniques; *Ln. fallax* de la choucroute, *Ln. argentinum* du lait cru de l'Argentine, *Ln. gasicomitatum* lié à la détérioration de viande, *Ln. kimchii* et *Ln. inhae* provenant du kimchi, *Ln. ficulneum* des figues mûres et *Ln. fructosum* (précédemment *Lb. fructosus*). Les souches trouvées dans la

microflore de *Vespula germanica* présentent une homologie de 90% avec les espèces connu de *Leuconostoc* et peuvent constituer un nouveau taxon (Reeson *et al.*, 2003).

Tableau 1 : Les espèces incluent dans le genre de *Leuconostoc*

Les espèces récentes de <i>Leuconostoc</i>	L'ancienne nomenclature
<i>Ln. mesenteroides</i>	
subsp. <i>cremoris</i>	
subsp. <i>dextranicum</i>	
subsp. <i>Mesenteroides</i>	
<i>Ln. lactis</i>	
<i>Ln. pseudomesenteroide</i>	
<i>s</i>	
<i>Ln. carnosum</i>	
<i>Ln. gelidum</i>	
<i>Ln. fallax</i>	
<i>Ln. citreum</i>	<i>Ln. amelibiosum</i>
<i>Ln. argentinum</i>	
<i>Ln. gasicomitatum</i>	
<i>Ln. kimchi</i>	
<i>Ln. ficulneum</i>	
<i>Ln. fructosum</i>	<i>Lactobacillus fructosus</i>

4.3. Comparaison des méthodes d'identification:

Bien que les méthodes moléculaires soient utiles pour la taxonomie et la phylogénie des souches, les caractères phénotypiques demeurent rationnels et jouent un rôle prédominant dans la microbiologie alimentaire. On s'intéresse souvent aux souches utilisées comme outils dans des activités humaines qui est souvent liée au moins à une propriété importante et la compréhension de la relation entre le génotype et le phénotype qui représente un grand défi (Morriset *et al.*, 2002).

Ainsi, les souches de *Ln. fallax* qui ont été caractérisées par des méthodes phylogéniques (Barrangou *et al.*, 2002), pourraient également être distinguées des *Ln. mesenteroides* par la réaction malolactique, qui est absente dans l'ancienne espèce mais présente dans la nouvelle espèce. Ceci souligne l'intérêt de l'étude des critères phénotypiques qui pourraient être employés systématiquement avant le passage par les techniques moléculaires, en effet la fermentation de l'arabinose, le raffinose, et le fructose (Cibik *et al.*, 2000), la résistance à la vancomycine, la production du CO₂, la production du dextrane, ainsi que l'utilisation de citrate et la capacité du *Leuconostoc* d'acidifier le lait à pH 6.5 et à 4.1 ont permis de distinguer entre 107 souches testées pour des applications en technologie laitière par des études faites par Demirci et Hemme, 1995. Une étude similaire récente a proposé une caractérisation des souches de bactérie lactique, sur la base des composés neutres produites dans le petit lait (Mauriello *et al.*, 2001). Quelques outils qui ne sont pas adéquats à la caractérisation de l'espèce pourrait néanmoins être employé pour décrire un groupe réduit de souche, le profil plasmidique et la fermentation d'hydrate de carbone pour distinguer physiologiquement les souches productrice de dextrane ou bien le métabolisme de citrate, profil type de la fermentation d'hydrate de carbone et l'activités peptidase pour sélectionner les souches les plus importantes sur l'échelle technologiques (Server-Busson, *et al.*, 1999). Cliniquement les souches de *Leuconostoc* ont été identifiés par la résistance à la vancomycine (VAN), et par le marquage de Leu-aminopeptidase (LAP) et l'activité pyrrolidonylarylamidase (PYR) en utilisant la méthode de diffusion (les disque) (Facklam, *et al.*, 1995).

5. Croissance du *Leuconostoc*

5.1. Culture et conservation des cultures

5.1.1. Isolement et milieux de cultures

Comme toute les BL (Bactéries Lactiques) l'isolement des *leuconostocs* s'effectue par la méthode de dilution dans l'eau peptonée (1 g de peptone + 8.5 g NaCl) devraient être employés (Foucaud *et al.*, 2001).

L'isolement de *Leuconostoc* peut être accompli en utilisant des bouillons d'enrichissement et des milieux sélectifs ou non sélectifs, selon le besoin d'isoler un genre particulier d'un mélange des micro-organismes ou de maintenir des isolats dans la culture (Bjorkroth et Holzapfel, 2003).

Les milieux de cultures qui répondent aux exigences nutritionnels générales (également appelées électives) du *Leuconostoc* permettent normalement des taux élevés de croissance, sans empêcher complètement d'autres genre de bactéries lactiques « *Lactobacillus* » de croître. Les plus communs sont APT, Briggs, MRS, et BHIYE. En raison de leur basse sélectivité, leur application est limitée aux communautés dominées par un type ou un groupe de micro-organismes. On a proposé des milieux sélectifs, qui contiennent un ou plusieurs facteurs restrictifs, qui permettent la croissance du *Leuconostoc* mais inhibe toujours les autres groupes bactériens dans une culture mixte. Cependant, aucun milieu complètement efficace n'est pourtant disponible. La plupart des milieux de cultures sélectifs basés sur la capacité de métaboliser le citrate se sont avérés insuffisants parce que beaucoup de bactéries dans le même habitat (par exemple, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* métabolisent également le citrate et pas tout les espèces de *Leuconostoc* sont capables d'utiliser le citrate). La nature acidophile ou leur préférence pour les micro-aérophiles aux conditions anaérobies a été pris en considération. Des facteurs inhibiteurs tels que le sorbate de potassium (MRSS pH 5.7), l'acétate thallium (MRST pH 6.5), azide de sodium (MSE), ainsi que les antibiotiques tels que la vancomycine ou la tétracycline ont été plus ou moins efficace (Mathot *et al.*, 1994).

Le milieu habituel pour la purification des souches de *Leuconostoc* est le MRS milieu classique ou modifié par l'absence de l'extrait de viande et de citrate, les milieux de cultures utilisés pour réaliser des études physiologiques : le profil fermentaire des sucres, production de gaz, formation de dextrane, dégradation de citrate et d'autres ont été développés et utilisés (Bjorkroth et Holzapfel 2003).

Dans une culture mixte de *Leuconostoc* avec *Lactococcus* sur MRS contenant $30\mu\text{g mL}^{-1}$ de vancomycine qui reste le milieu le plus simple et efficace pour détecter *Leuconostoc*, les *Lactococcus* seront inhibés par des faibles concentrations (la concentration inhibitrice minimale est inférieure à $2.5\mu\text{g mL}^{-1}$, mais puisque il est possible de rencontrer des souches de *Lactobacillus* résistantes à la vancomycine il est préférable d'utiliser le milieu LUSM additionné à la vancomycine, tétracycline et jus de tomate. (Mathot *et al.*, 1994). Le milieu M17 contenant 5% de glucose pourraient également être employé puisque *Lactococcus* donne des grandes colonies après 24 h tandis que *Leuconostoc* exige 48 h (Liu, *et al.*, 1997). Sur milieu MRS avec 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside les souches de *Leuconostoc* qui sont β -galactosidase (β -gal) positives donnent des colonies bleues qui peuvent être distinguées

des *Lactococcus* qui sont négatives (Mathot *et al.*, 1994; Bellengier *et al.*, 1997). Ce milieu est également pratique pour la détection du genre ainsi il est utilisé pour la distinction entre les espèces de *Leuconostoc* qui sont β -gal positives des espèces β -gal négatives.

Leuconostoc se développent à 30°C comme les *Lactococcus* mésophiles mais favorisent une température plus basse. La plupart des souches se développent bien à 10°C et même à 4°C (Hamasaki *et al.*, 2003).

5. 1.2. Conservation des cultures

Pour la conservation à court terme de *Leuconostoc*, des cultures jeunes peuvent être ensemencé sur MRS agar contenant 1% lactose et stockées à 4°C pendant 1 –2 semaines. La viabilité peut être maintenue en lait de tournesol contenant 5% d'extrait de levure et 5% de glucose ou dans du bouillon MRS contenant 1% de lactose et 10% de glycerol en tant qu'agents protecteurs pendant 6 mois à 1 année à -20°C ou excédent pendant longue période à -80°C. L'utilisation des cultures en phase exponentielle donne une viabilité maximum lors de la congélation (Bellengier *et al.*, 1997; Bjorkroth et Holzapfel, 2003). La lyophilisation des souches de *Leuconostoc* d'intérêt dans du lait contenant 4% de lactose a eu comme conséquence une bonne survie à long terme et une bonne conservation des caractéristiques métaboliques.

6. Resistance des *Leuconostoc* au stress

Les espèces de *Leuconostoc* peuvent survivre à de longues durées dans les environnements défavorables aussi divers que le sucre, le pétrole ou les industries laitières. Elles sont restées viables pendant plusieurs années sur la surface « du gerle en bois » (**Fig.2**), les moules en métal ou en plastique et d'autres outils en bois ou en verre utilisés dans les fromageries traditionnels (Devoyod et Poullain, 1988). L'environnement hostile favorise les phénomènes d'interaction à travers la formation des colonies visqueuses en présence du saccharose et des traces minéraux, sous forme d'un biofilm, qui protège les cellules contre les agents nuisibles (Kim, *et al.*, 2000). Le lait caillé du fromage muri permet probablement la survie du *Leuconostoc* qui ont été détecté à un niveaux cellulaires très élevés (Devoyod et Poullain, 1988; Mor-Mur, *et al.*, 1994).

Dans une solution tamponnée avec un tampon de potassium, la capacité des cellules non proliférantes de se lyser était inférieure pour les cellules développées en MRS contenant le lactose ou le galactose que celui qui contient du glucose et varie en fonction de la souche de 7% à 44% après 24 h d'incubation à 30°C et à pH 6,5 (Cibik et Chapot-Chartier, 2000). En technologie fromagère, la dépendance des souches de *Leuconostoc* a été également démontrée et une faible lyse qui a été observé confirme celle observé dans le tampon (Martley et Crow, 1993).

L'homéostasie du pH interne est essentielle pour la croissance et la survie de tout les micro-organismes, y compris *Leuconostoc* mais la croissance bactérienne est un processus d'autoinhibition par l'acidification du milieu externe et l'accumulation d'acide (Cogan et Jordan, 1994; Konings, 2002). Par exemple quand le pH du milieu externe se diminue, le pH interne des cellules de *Ln. mesenteroides* diminue aussi contrairement aux espèces de *Lc. Lactis*. La croissance s'arrête quand les valeurs du pH internes « cellulaire » atteintes 5.4 à 5.7. En revanche, le pH cellulaire externe est considérablement influencé par le pH du milieu de culture, la concentration et la nature des acides organiques.

La réponse au choc de la chaleur chez les espèces de *Ln. mesenteroides* consiste à l'arrêt de l'expression des protéines de stress (Salotra *et al.*, 1995). La régulation du choc thermique se fait par une protéine homologue : la Ctsr cette dernière a été identifié chez *Oenococcus oeni* et chez les autres bactéries Gram positives, suggérant également son existence chez *Leuconostoc* (Derre, *et al.*, 1999).

Les technologies des techniques de préservation et de conservation, telles que la technologie de la haute pression, qui combinent la réduction efficace de germe, la rétention maximale des produits chimiques et des propriétés physico-chimiques de produit, font actuellement l'axe de recherche. Wuytack, *et al.*, (2002) ont réalisé des traitements à haute pression s'étendant entre 100 et 300 MPa d'homogénéisation à 25°C pendant 15 minutes et qui ont prouvé que les bactéries Gram positives, incluant les *Ln. mesenteroides* étaient plus résistantes que les bactéries Gram négatives. La structure du peptidoglycane contribue probablement à la résistance tandis que tous les deux groupes ont dissimulé à une pression hydrostatique élevée. La destruction du *Leuconostoc* dépend du niveau de la pression et la durée du traitement, la résistance des *Ln. mesenteroides* a la pression étant inférieurs à celui de *saccharomyces cerevisiae* (Basak, *et al.*, 2002).

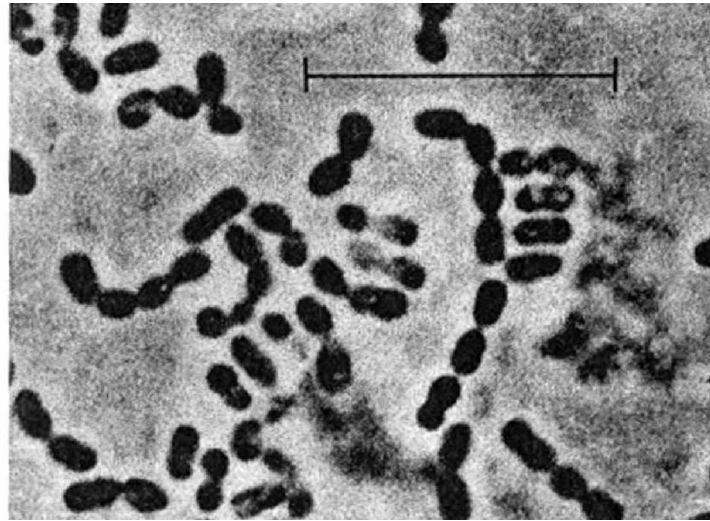


Figure1 : *Leuconostoc mesenteroides*, image au microscope à contraste de phase .La barre=10μm

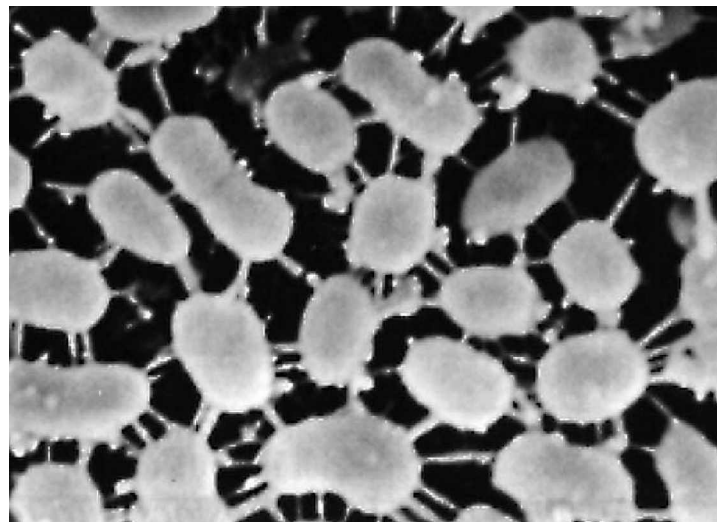


Figure2 : L'adhérence du *Leuconostoc* sur le moule du gré glacé, examen réalisé par microscopie électronique (Devoyod et Poullain, 1988)

7. Métabolisme du *Leuconostoc*

Le métabolisme général du *Leuconostoc* est présenté dans la Figure3, sa connaissance a beaucoup progressé au cours de ces dernières décennies, en particulier en ce qui concerne le transport des substrats dans l'espace intracellulaire et les processus énergétiques qui sont associés.

Les leuconostocs sont assimilés reconnus pour être très exigeants, du point de vue nutritionnel, ils sont considérés comme faisant partie de la famille des bactéries hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils n'assimilent que faiblement le dioxyde de carbone et requièrent pour leur développement des substances organiques supplémentaires (Khedid *et al.*, 2006).

Il a été démontré que la croissance des bactéries lactiques et en particulier des leuconostocs étaient contrôlées par deux principaux facteurs : l'acide lactique qui inhibe et les substances nutritives qui limitent la croissance de ces bactéries. Il est à noter que l'effet de ces facteurs est fortement dépendant de la composition du milieu de culture (Bibal *et al.*, 1989).

7.1. Utilisation d'hydrate de carbone

Leuconostoc ne possède pas les cytochromes fonctionnels et manque de quelques enzymes de cycle de Krebs ces bactéries ont besoin d'un apport de nutriments comportant au moins un sucre fermentescible comme source d'énergie (Cogan et Jordan 1994). Une grande variété de mono- et de disaccharides maintiennent la croissance des leuconostocs (Server-Busson *et al.*, 1999). La fermentation de l'arabinose, le xylose, le ribose, et le fructose par les souches de *Leuconostoc* constitue un critère phénotypique important pour la caractérisation d'espèce, de sous-espèce et pour la caractérisation et le choix des souches de grand intérêt pour l'application industrielle.

La fermentation des sucres s'effectue principalement en deux étapes, premièrement, le transport des hydrates de carbone à travers la barrière hydrophobe de la membrane cellulaire. Deuxièmement la dégradation du sucre et la formation et l'expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

7.1.1. Transport de sucre

Les cellules de *Leuconostoc* ramasse les hydrates de carbone par les perméases qui permettent l'entrée des sucres dans la cellule sans modification du substrat (par exemple phosphorylation quand le système de phosphoénolpyruvate-phosphotransférase « PEP-PTS » est impliqué). le système PEP-PTS est constitué de trois enzymes (EI, EII^{Lac} et EIIL^{Lac}) et d'une protéine de transport (HPr) (Hengstenberg et al., 1989). EI catalyse le transfert du phosphate du phosphoénolpyruvate à un déchet Histidine de HPr, EII^{Lac} et EIIL^{Lac} sont des enzymes inductibles spécifiques du lactose et catalysent le transfert du phosphate du HPr au lactose de plus EII^{LAC} est une protéine membranaire, qui fixe spécifiquement le sucre et assure son transport (Thompson, 1989)

7.1.2. Catabolisme de sucre

Le métabolisme des sucres chez ce genre de bactérie lactique s'effectue par la voie hétérolactique qui utilise les voies de la glycolyse et celle du pentose -6 phosphate, et conduit à l'abaissement du pH et à la production d'acides organiques (Ignacio Sanchez et al., 2005).

Les leuconostocs fermentent le glucose en quantité équimolaires de D(-) lactate, éthanol (acétate), le CO₂ (Kihal et al., 2006) et le pyruvate. Le pyruvate est encore réduit par un D- lactate déshydrogénase en D- lactate qui sera ensuite employé pour la synthèse de peptidoglycane. Le gène de D- lactate déshydrogénase, *D-ldh* de *Ln. mesenteroides* a été cloné par Phalip et al., (1994). La réaction finale pourrait être affectée par l'acétaldéhyde exogène, qui est pris du milieu quand il existe et utilisé comme un récepteur d'électron. La proportion des métabolites dépend de la conversion de l'acétyl-P formé à partir du xylulose-5-P. L'acétate kinase dirige le flux vers la formation de l'acétate avec production d'ATP, l'énergie supplémentaire étant employée pour la croissance, tandis que le phosphotransacetylase (ATP) produit acétyl-CoA qui est employé pour la biosynthèse ou pour le ré-oxydation du NADH avec la production de l'éthanol par l'alcool déshydrogénase. Le gène *pta* qui a été cloné semble ne pas être associé au gène de l'acétate kinase, les deux gènes étant comme monocistronique de transcription (Bourel et al., 2001).

Leuconostoc fermente le fructose à fructose-6-P, qui pénètre alors dans la voie de pentose-P et se converti en mannitol sans Co-formation du sorbitol (Von Weymarn, *et al.*, 2002a). L'oxydation de NADH vers NAD⁺ est achevée par la réduction du fructose en mannitol par une NADH- dépendant mannitol déshydrogénase. Ceci affecte l'équilibre redox de la cellule et favorise la production de l'acétate au lieu de l'éthanol de sorte qu'un ATP soit gain. L'enzyme est un tétramère de 4 sous-unité identique d'environ 38 kDa (Aarnikunnas, *et al.*, 2002; Hahn *et al.*, 2003). Hahn *et al.*, (2003) ont cloné le gène de mannitol déshydrogénase (*mdh*). La séquence du gène et de l'enzyme sont distinctes de ceux des autres bactéries lactiques, les hybridations se sont produites faiblement avec quelques souches de *Lactobacilles* hétérofermentaires. La question est demeurée pour savoir si cette particularité est liée à l'utilisation du fructose comme un accepteur d'électron.

Le galactose et le mannose sont probablement employés par l'intermédiaire de la voie de Leloir (Cogan et Jordan 1994). Les gènes du galactose sont codés par le chromosome et le gène *galK* du *Ln. lactis* a été étudié et cloné récemment (Grossiord, *et al.*, 1998). L'utilisation de la voie du D-tagatose a été récemment étudié (Bertelsen, *et al.*, 2001).

Des pentoses sont convertis en xylulose-5-P qui sera catabolisé ensuite en glycéraldéhyde-3-P et acétyl-P. Ni l'éthanol et ni l'acétaldéhyde n'est produit et 1 mole d'ATP et d'acétate sont formés à partir d'acétyl-P (Cogan et Jordan, 1994).

Le lactose est clivé en galactose et glucose par la β -galactosidase (β -*gal*) qui est codé par deux gènes super enrouler (*lacL* et *lac M*), qui sont fortement homologues (99%) avec ceux de *Lb.casei* (Cogan., 1995). Les deux monosaccharides sont alors employés par l'intermédiaire de la voie de Leloir et de pentose-P, respectivement. La plupart des souches de *Leuconostoc* se développent en présence d'une basse concentration de lactose (20 g L⁻¹), tandis que peu exige une concentration élevée, équivalente à celle qui existe dans le lait (50 g L⁻¹) ou plus. Dans ce cas, l'induction des β -*gal* peut limiter la croissance (Carr *et al.*, 2002).

L'utilisation de raffinose par *Leuconostoc* varie d'une espèce à une autre et les enzymes impliquées sont (l' α -galactosidase et la β -fructosidase), ce caractère a été étudié dans la limite de l'équilibre de fermentation et de l'induction (Server-Busson *et al.*, 1999; Carr *et al.*, 2002).

Dans les milieux de cultures à base de saccharose, une large fraction de ce dernier, est convertie en dextrane qui se libère à l'extérieur de la cellule et en fructose dans l'espace cytoplasmique. L'autre fraction pénètre dans la cellule, où elle sera phosphorylée par une phosphorylase de saccharose puis converti en glucose-6-P. Le gène de phosphorylase de saccharose de *Ln.mesenteroides* a été détecté et cloné par Kawasaki, *et al.*, (1996).

Quelques polysaccharides (par exemple cellulose) sont aussi métabolisée (Carr *et al.*, 2002) comme les dextrans qui sont des exopolysaccharides difficiles à la dégradation (Eggleston et Legendre, 2003) mais peu d'information sont connus relativement sur l'excrétion des produits métaboliques finaux et la régulation du catabolisme des hydrates de carbone.

7.2. Métabolisme d'acide organique

Le citrate et le malate sont les deux principaux acides organiques métabolisés par *Leuconostoc*, le métabolisme du premier est la fonction importante chez certaines espèces lactiques de ce genre conduisant à la formation d'arôme, notamment le diacétyle et à la production du gaz en produits laitiers (Kihal *et al.*, 1996, Ignacio Sanchez *et al.*, 2005), tandis que le dernier n'a pas d'importance parce que le lait ne contient pas du malate (Konings, 2002).

Le citrate présent dans le lait à (8 mM) et d'avantage dans le caillé du fromage il n'est pas comme une source unique d'énergie chez *Leuconostoc* mais peut être dégradé en présence d'un sucre fermentescible et d'une source d'azote. Le transport du citrate à travers la membrane cellulaire est assuré à l'aide d'une citrate perméase, ou il est scindé en acétate et en oxalo-acétate par le complexe enzymatique citrate-lyase (Bekal *et al.*, 1998) selon un système de transport secondaire dépendant d'une force proton motrice (Bourel *et al.*, 2001). L'Arg₄₂₅ de la perméase est impliqué dans le procédé de transport du citrate et des S-énantiomères des autres substrats avec un 2-hydroxycarboxylate (Bandell et Lolkema., 2000; Bourel *et al.*, 2001).

Intérieurement, Hcit⁻² est encore dégradé en acétate et oxalo-acétate, qui sera décarboxylée en pyruvate. L'addition du citrate au glucose augmente le taux de la croissance spécifique et le rendement de la croissance molaire chez *Ln. mesenteroides*

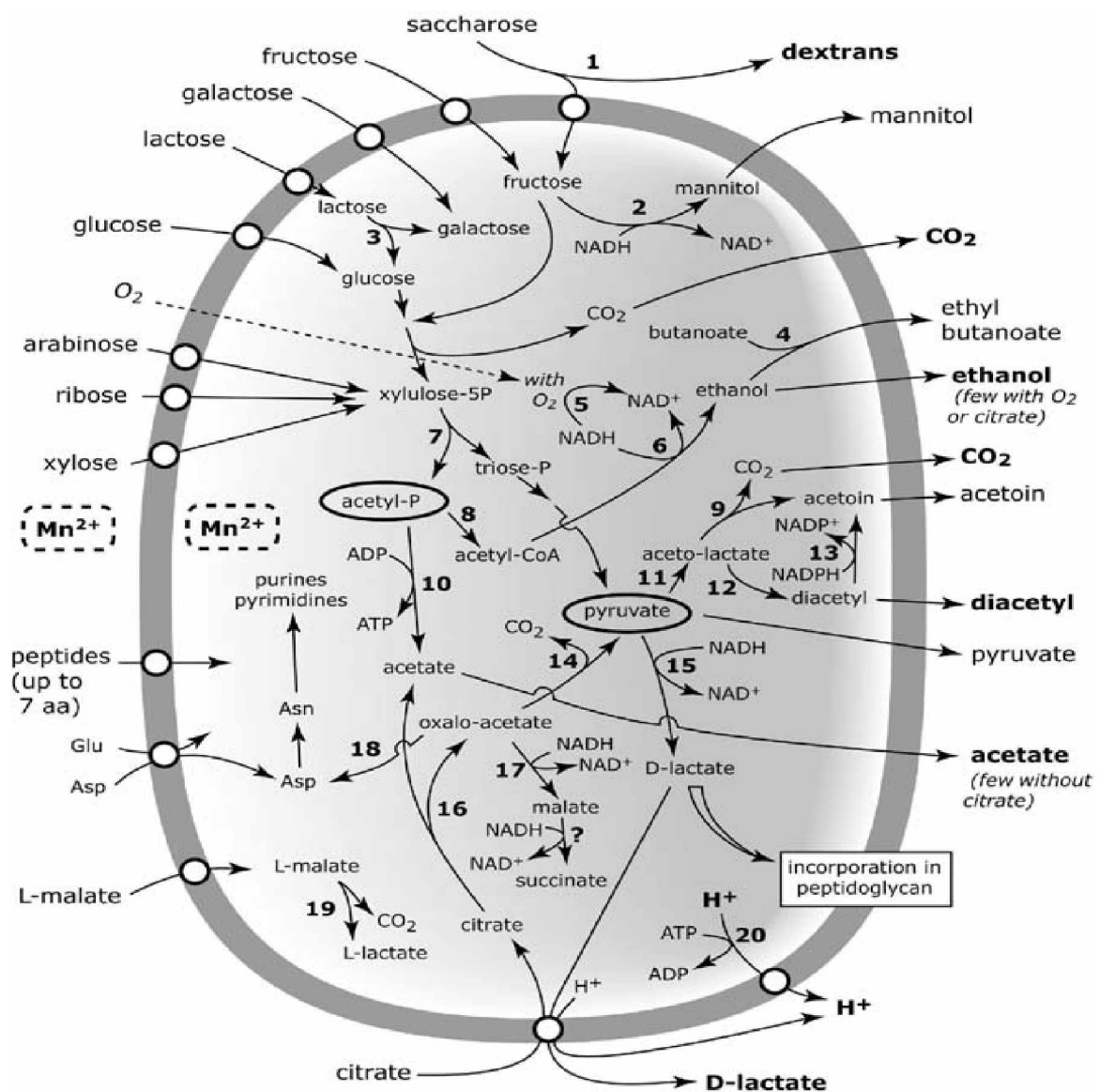


Figure 3 : Métabolisme général du *Leuconostoc*. Les produits principaux formés sont indiqués dans "bold". Les nombres se rapportent à des enzymes impliquées ou à des étapes: (1) Dextrane- saccarose; (2) Mannitol-déshydrogénase; (3) β -galactosidase; (4) Estérase; (5) HADH oxydase ; (6) alcool- déshydrogénase; (7) Phosphoketolase; (8) Phosphotransacetylase, (9) α -acétolactate décarboxylase; (10) Acétate kinase ; (11) α -acétolactate synthase; (12) décarboxylation non-enzymatique ; (13) Diacétyle réductase; (14) Décarboxylase d'oxaloacétate; (15) lactate déshydrogénase; (16) Metabolisme du citrate; (17) Malate déshydrogénase; (18) Formation d'aspartate; (19) Enzyme malolactique; (20) ATPase. (Foaud., 2004)

dans ces conditions, le lactate est produit à partir du métabolisme de citrate et du glucose et les échanges entre le citrate et le lactate favorise le métabolisme du citrate. Konings (2002) a étudié la conservation d'énergie métabolique et l'homéostasie de pH par le métabolisme de citrate chez *Ln. mesenteroides*.

L'utilisation du citrate mène à la formation du diacétyle, qui est un composant important de saveur des produits laitiers, et d'autres composés tels que l'acétate, l'acétoïne et le 2,3-butanediol. Une partie des réactions prévues impliquées dans la formation du diacétyle reste peu clair. Deux voies différentes peuvent conduire au diacétyle ou l'acétoïne par l'acétoïne réductase ou 2-3 buthylène glycol déshydrogénase. Alors le diacétyle pourrait être produit par l'intermédiaire du diacétyle synthase bien que cette enzyme n'ait pas été clairement détectée dans d'autres bactéries lactiques. L'autre manière d'obtenir le diacétyle, est la décarboxylation oxydative d'un α -acétolactate formé à partir du pyruvate. Récemment, le décarboxylase d'acétolactate du *Ln. lactis* a été purifié et séquencé (O'Sullivan, *et al.*, 2001).

Le Co-métabolisme du citrate plus xylose chez *Ln. mesenteroides* a comme conséquence une stimulation de la croissance, une augmentation de production de D - lactate et d'acétate et une répression de la formation de l'éthanol (Schmitt *et al.*, 1997). Ceci se corrèle avec la formation d'acétyle-P de pentose.

Les espèces de *Leuconostoc cremoris* sont capables de produire le diacétyle à partir du citrate, ce processus est très important dans l'industrie laitière (Dellaglio *et al.*, 1995).

Les mécanismes génétiques du transport et du métabolisme de citrate ont été progressivement étudiées. Lin *et al.*, (1991) ont montré que les gènes codants pour la citrate perméase sont portés par des plasmides et sont localisées sur des plasmides de 23 Kb Chez les *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides*. Kihal *et al* (1996) ont constaté l'instabilité de ce caractère puisque qu'il est liée à la perte du plasmide citrate, tandis que Bourel *et al* (2001) ont montré que ce phénotype semble stable chez *Ln. lactis* et la souche de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Ec 195) puisque qu'il est localisé sur le chromosome donc l'existence d'une exception est possible.

Les gènes impliqués dans la dégradation du citrate sont chromosomiques et disposés dans un lieu de *clyR-mae-citDEF* dans des *Ln. mesenteroides* (Bourel *et al.*, 2001). Les gènes de la citrate perméase (*citP*) de *Ln. lactis* (Vaughan *et al.*, 1995) ou *Ln. Mesenteroides*, le gène d'utilisation du citrate (*cit CDEFG*) de *Ln. mesenteroide* ou (*cit MCDEFGR P*) des *Ln. paramesenteroides* ainsi que le gène d'une protéine putative de régulation la *clyR* (Bourel *et al.*, 2001) ont été séquencé et clonés. L'enzyme diacétyle -réductase a été purifié et le gène a été cloné et séquencé par Rattray *et al.*, (2003).

La plupart de bactéries lactiques, y compris *Leuconostoc* à l'exception de *Ln. fallax* effectuent la fermentation malolactique avec la formation de L-lactate et CO₂ à partir du malate par l'enzyme malolactique (Barrangou *et al.*, 2002; Konings, 2002).

7.3. Métabolisme de composés azoté

7.3.1. L'exigence des acides aminés :

Les souches de *Leuconostoc* sont des microorganismes fastidieux, exigent pour leurs croissances des acides aminés et des vitamines en plus des hydrates de carbone fermentescibles. Les exigences nutritionnelles pour des acides aminés est variable considérablement entre les espèces et les souches, les acides aminés leucine, isoleucine et valine, aussi bien que la glutamate sont avérés essentiels, ainsi que la serine qui stimule la croissance de quelques souches de *Leuconostoc*, alors que l'alanine n'est pas exigeant par toutes les leuconostocs (Foucaud *et al.*, 2001).

Les espèces appartenant au *Ln. mesenteroides* peuvent synthétiser l'aspartate de l'oxaloacétate par l'intermédiaire de la transamination, qui peut être plus tard convertie en Asparagine et participe à la biosynthèse des pyrimidines et des purines (Konings., 2002). L'aptitude du leuconostoc d'utiliser des acides aminés libres ou comme mélange en présence ou en absence d'un accepteur aminé supplémentaire varie selon les souches et les espèces, suggérant que *Leuconostoc* offre soit un grand potentiel à la production de la saveur des acides aminés ou cible légèrement la physiologie et la maturation de fromage (Tavaria, *et al.*, 2002; Liu, *et al.*, 2003).

7. 3.2. Le système protéolytique

Leuconostoc se développe mal dans le lait puisque aucune souches n'excède 5×10^8 ufc ml⁻¹. La croissance des *Leuconostoc* peut être stimulé jusqu'au 10^9 ufc ml⁻¹ quand le contenu du (NPN) du lait est artificiellement augmenté par l'addition des acides aminés ou des peptides (par exemple mélange d'acide aminé, extrait de levure, etc.). Ceci indique qu'ils manquent d'activités protéolytiques proportionnées qui pourraient leur fournir NPN assimilable (Bellengier *et al.*, 1997).

7.3.2.1. L'utilisation de protéine : Contrairement au *Lactococcus*, peu d'attention a été consacré au système protéolytique de *Leuconostoc* bien que peu de souches aient montré quelques activités caséinolytiques, ceci n'a pas contribué beaucoup à la croissance. Trois composants structuraux sont impliqués dans ce métabolisme ; les protéases qui hydrolysent les caséines en peptide, les peptidase dégradent les peptides et les système de transport qui permet le passage des produits issus de la dégradation à travers la membrane cytoplasmique (Herreros *et al.*, 2003).

7.3.2.2. L'utilisation et le transport de peptides : *Ln. mesenteroides* peut utiliser un grand nombre de Di-et des tri-peptides et oligopeptides jusqu' à sept résidus d'acides aminés pour la croissance (Foucaud *et al.*, 2001). Les capacités varient selon les souches. Aucune dégradation extracellulaire des peptides ne se produit pendant le transport de peptide. Des peptidases sont localisées au niveau intracellulaire (Foucaud *et al.*, 2001).

Des systèmes séparés de transport ont été montrés pour échanger la prise des acides aminés et de leurs dipeptides chez *Ln. mesenteroides* (Foucaud *et al.*, 2001). Récemment, le système de transport d'oligopeptide pour des peptides contenant au moins quatre résidus d'acide aminé ont été caractérisés dans *Ln. mesenteroides*. Le transport des peptides peut être augmenté en présence des ions de Mg^{+2} ou de Ca^{2+} (Germain -Alpettaz *et al.*, 2002). Les profils peptidases de la plupart des souches de *Leuconostoc* sont comparables à ceux du *Lc. lactis* (Foucaud *et al.*, 2001; Herreros *et al.*, 2003). Cependant, dans l'extrait cellulaire du *Leuconostoc*, l'activité de carboxypeptidase était soit significative soit faible ou absente (Macedo, *et al.* ,2000; Herreros *et al.*, 2003), alors qu'une telle activité n'était pas définitivement observée en employant les cellules entières, suggérant l'absence d'un carboxypeptidase ou bien l'absence d'un système adéquat de transport ou de la spécificité de la peptidase existante (Foucaud *et al.*, 2001).

7.3.2.3. Le transport et l'utilisation des acide aminé : le transport des acides aminés à chaînes branchées dans les membranes cytoplasmiques chez les espèces de *Ln. mesenteroides* a été caractérisé comme un système canal dépendant d'une force proton-motrice- (Winters, *et al.*, 1991). Récemment, les systèmes multiples de transport d'acide aminé ont été caractérisés en utilisant les cellules entières de la bactéries, certains de ces systèmes ont été partagés par plusieurs acides aminés et leurs caractéristiques cinétiques pourraient être un outil supplémentaire pour estimer la biodiversité des leuconostocs (Gendrot *et al.*, 2002) bien que leur activité ne limite pas la croissance.

7. 4. Métabolisme de leuconostoc en présence de l'oxygène

Habituellement les métabolites issus d'une fermentation anaérobie du glucose chez ce genre exigent de bactérie lactique sont essentiellement le lactate, l'éthanol et le CO₂, mais dans les conditions aérobies l'acétate est largement substitué à l'éthanol et les vitesses de la croissance ainsi que le métabolisme de glucose sont plus rapide qu'en absence d'oxygène. Ainsi la fermentation hétérolactique des leuconostocs en présence d'oxygène est liée à une augmentation du rendement de l'ATP et conduit à une accélération de la croissance et à une production augmentée de biomasse (Plihon, *et al.*, 1995).

L'oxygène est employé comme un accepteur alternatif d'électron et se réduit en peroxyde d'hydrogène plus eau (Condon, 1987; Cogan et Jordan, 1994). Ceci est dû à la plus grande synthèse de NADH oxydase et de l'acétate-kinase, qui régénère efficacement la réduction des équivalents pour continuer la fermentation et seul l'acétyl-P est employé pour la formation de l'ATP et de l'acétate plutôt qu'à la réduction à l'éthanol comme dans le Co-métabolisme du sucre et du citrate. La NADH oxydase de *Ln. mesenteroides* a été décrite comme un dimère ou un tétramère avec une masse moléculaire de sous-unité de 53 ou 55 kDa, respectivement, dépendant probablement de la souche et du FAD comme cofacteur (Sakamoto, *et al.*, 1996).

Les niveaux intracellulaires élevés du manganèse Mn⁺² (6-10 mmolL⁻¹) pourraient fournir au *Leuconostoc* autant qu'une autre bactérie lactique, un mécanisme important

de défense contre l'O₂⁻ endogène et toute autre réaction de l'oxygène. Ceci pourrait être lié à leur habitat original où le manganèse Mn⁺² est présent à des concentrations élevées (Horsburgh *et al.*, 2002).

7. 5. Métabolisme lipidique :

La détection de l'activité estérase chez *Leuconostoc* avec des galeries enzymatiques (Biomérieux, France) en employant le β- naphthyle comme substrat (Millière *et al.*, 1989) a montré des taux d'hydrolyse progressivement faible .

Meyers, *et al.*, (1996) n'ont pas détectée l'hydrolyse de la tributyrine, du trioleine, et de la tributyrine ou du beurre chez *Leuconostoc* en utilisant milieu Elliker-rhodamine tandis que l'hydrolyse de la tributyrine a été récemment décrite chez *Ln. mesenteroides* en utilisant les dérivés de naphthyle et la détection postélectrophoretique (Katz *et al.*, 2002). *Leuconostoc lactis* synthétise principalement les esters éthyliques et butyliques de la tributyrine et de l'éthanol pendant l'incubation dans un bouillon par l'intermédiaire d'une réaction de transférase (Liu, *et al.*, 2003b). Il a été démontré que le S-methylthioacetate est le seul thioester constitué par des cellules de *Leuconostoc* incubées avec le methanethiol seul ou en conjonction avec des diverses chaînes courtes d'acides gras (Lamberet, *et al.*, 1997).

8. La génétique des *Leuconostocs* :

L'étude de la génétique des leuconostocs est récente comparée à celle d'autres bactéries la plupart des intérêts génétique autrefois s'étaient concentré sur l'instabilité des phénotypes essentiels dans les fermentations d'intérêt industriel (Dessart et Steenson.,1995) ; mais elle a évolué rapidement au cours de la dernière décennie. Son domaine couvre plusieurs axes de recherche :

- l'étude des conditions de mutagènes des bactéries et de l'obtention de variant ou de mutants.
- l'exploitation de leur génome : la caractérisation du chromosome, des plasmides et le gène qui les constituent.

-l'étude des systèmes de transfert naturels, in vitro, existent parmi les bactéries lactiques.

-la mise au point de transfert de gène in vitro par la technologie de l'ADN recombiné, fondement du génie génétique.

Le matériel génétique ou le génome de *Leuconostoc* est formé de plusieurs molécules d'ADN distinctes capable de se répliquer de manière autonome ; on parle de réplicons. Le plus grand d'entre eux, formé de 1800 à 2600 kilos pairs de bases (KPB), le chromosome (ou nucléosome) qui porte l'ensemble des gènes nécessaires aux synthèses cellulaires, à la croissance et à la division cellulaire et qui est responsable de l'identité de l'espèce bactérienne.

Les cellules bactériennes peuvent contenir aussi des éléments extra chromosomiques : des réplicons plus petit, généralement libres dans le cytoplasme, appelés plasmides, et le génome d'un ou de plusieurs phages tempérés, le plus souvent intégrés dans le chromosome (De Roissart et Luquet, 1994).

Comme toute Les bactéries de la flore lactique les leuconostocs ont des pourcentages de G+C très différent d'une souche à une autre, la classification bactérienne proposée par Larpent, (2000) les a classé parmi les bactéries à Gram (+) à un faible pourcentage de G+C.

Les espèces de *Leuconostoc* héberge un ou plusieurs plasmides indigènes de diverses tailles. L'utilisation de lactose, l'activité du citrate perméase (Dessart et Steenson, 1995), la production de bactériocine, et la diacétylase réductase (Rattray *et al.*, 2003) sont tous des caractères liés à des plasmides mais la fonction de la majorité des plasmides n'a pas encore été connu. L'organisation génétique et le mode de répllication des petits plasmides cryptiques ont été récemment décrits (Biet, *et al.*, 1999 ; Biet, *et al.*, 2002).

La séquence nucléotidique et l'organisation structurale du plasmide pCI411 (2,9 kb) du *Ln. lactis* 533 (Coffey *et al.*, 1994) et du plasmide pFR18 (1,8 KBS) des *Ln. mesenteroides* FR52 qui ont été étudié par Biet *et al.*, (1999) ont suggéré que leur répllication se fait par le mécanisme de cercle de roulement. Touts ces plasmides peuvent être utiles pour la construction des vecteurs d'intérêt.

9. Intérêt biotechnologique des leuconostocs :

Comme toutes les bactéries lactiques, les espèces appartiennent au genre *Leuconostoc* sont employées empiriquement depuis des siècles pour la fermentation d'un grand nombre de produits dans différentes industries. (Champagne, 1998).

En effet le rôle majeur de ces bactéries est la production d'acide lactique et du CO₂ qui change la texture, le goût et la qualité microbiologique des produits fermentés, (Devoyod et Poullain, 1988). La production d'acide facilite la coagulation des protéines par la présure et provoque l'abaissement du pH qui limite aussi la croissance des bactéries indésirables (Doleyres, 2003).

L'action de cette bactérie sur la conservation d'un aliment est liée à la production d'acide lactique et à l'abaissement du pH. Les leuconostocs peuvent aussi assumer la production de nombreux agents antibactériens tels que les bactériocines, qui contribuent à inhiber la croissance des flores indésirables et des germes pathogènes tel que *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*. Enfin elles ont une action déterminante sur les qualités organoleptiques des produits fermentés (Drouault et Corthier, 2001)

Les espèces aromatisantes des leuconostocs comme *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* produisent des composés aromatisants qui contribuent au goût des produits frais et à la production de CO₂ responsable d'ouvertures dans le fromage. Enfin, certaines espèces produisent des exopolysaccharides tel que le dextrane qui influence notamment l'aspect et la texture des produits fermentés. (Doleyres, 2003 ; Khedid *et al.*., 2006)

9. 1. Rôles dans la technologie agroalimentaire:

Les leuconostocs sont employés dans la production des produits alimentaires fermentés tel que le fromage, le yaourt etc., ce genre de bactéries lactiques donne une saveur caractéristique et améliore la texture et la saveur d'une grande variété de produits fermentés (Khedid *et al.*., 2006).

Les leuconostocs sont considérés comme une base d'amorçage bactérien requis dans l'industrie laitière, ces bactéries sont caractérisées par la production du CO₂ qui provient de l'hétérofermentation du lactose et de la dégradation du citrate (Bourel et *al.*, 2001).

Les espèces de *Leuconostoc mesenteroides* sont employées dans la fabrication des produits laitiers frais comme la crème fraîche, le beurre et le fromage frais. *Leuconostoc mesenteroides* est aussi utilisé dans la fermentation de choucroute et de vinaigre cette espèce se trouve dans la nature sur la surface des feuilles fraîches de chou (Cibik et *al.*, 2000)

Le rôle de *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* dans la production d'arôme a été bien décrit (Vedamuthu, 1994), mais cela a été moins identifié chez d'autres *Ln. mesenteroides*. *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* est connue depuis longtemps par son potentiel aromatique, était l'adjonction unique disponible. De la même manière, la littérature reflète plus l'utilisation du *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* que les autres espèces appartenant au même genre cela est due principalement à un manque d'information. En effet, il a été démontré que les isolats du fromage de lait cru appartiennent principalement aux *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* et *Leuconostoc citreum* mais pas à *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* (Devoyod et Poullain, 1988; Cogan et *al.*, 1997; Cibik et *al.*, 2001).

9. 1. 1. Les formations des ouvertures:

La formation des ouvertures et des cavités « Eyes » est la règle pour les fromages et en particulier le Roquefort à veines bleues qui seront ensuite colonisés par *Penicillium roqueforti*. En fromages mûris à pâte molle, *Leuconostoc* crée une cavité résultant de la production du CO₂. En cours de la fabrication des fromages Hollandais mûris tels que l'Edam, le Gouda et toute autre fromages salés, les petites ouvertures brillantes sont également dues à la production du CO₂ par *Leuconostoc* présent dans les cultures starter et sont pas liées aux ouvertures mécaniques (Martley et Crow, 1996 ; Khedid et *al.*, 2006).

Dans la production du fromage Roquefort, *Leuconostoc* représente de 5% à 10% de la concentration de *Lactococcus* ; c'est -à-dire 5×10^7 cellules par ml^{-1} du lait, la concentration minimale est de 10^6 cellules mL^{-1} . Des résultats optimaux ont été obtenus avec une sélection des souches de *Ln. mesenteroides* subsp *mesenteroides* utilisés en tant que suspensions cellulaire concentrées (Devoyod et Poullain, 1988.) Dans quelques cas, la population du *Leuconostoc* d'origine naturel de lait et de l'environnement est capable de créer des bonnes ouvertures (Martley et Crow, 1996).

La concentration maximal du CO_2 produit est de $16 \text{ le mmol kg}^{-1}$ au fromage, correspondant à l'utilisation de 8 mmol L^{-1} du citrate existant dans le lait, mais l'activité change entre les espèces et les souches (Bellengier, *et al.*, 1994). Les souches qui dégradent le citrate doivent se développer pendant les étapes préliminaires de la production du fromage (pression) bien que les conditions classiques (30°C) soient défavorables au *Leuconostoc*. Ils doivent survivre pour continuer ce métabolisme pendant la maturation en l'absence des hydrates de carbone (Bellengier, *et al.*, 1994).

9.1.2. Production d'arome

Les composés principaux liés à l'utilisation du *Leuconostoc* dans l'industrie laitière sont le diacétyle, l'acétate et l'éthanol contribuant également à la formation d'arome (Vedamuthu, 1994). Le niveau du diacétyle qui peut donner l'arome désiré est moins de (1,5 à 5 ppm) due à son bas seuil de flaveur. Le nombre suffisant des cellules et des conditions physico-chimiques particulières sont exigés pour l'utilisation optimale du citrate et de la production d'arome. *Leuconostoc* peut convertir le diacétyle en acétoïne et en 2,3-butanediol, qui ne donnent pas l'arome. Cette transformation défavorable pourrait être abaissée quand les produits tels que le lait fermenté sont refroidis après la production d'arome. Le stockage des fromages mûris se fait généralement à une température qui varie entre 10 à 13°C , au-dessus de celle exigé pour arrêter le processus.

L'acétaldéhyde excessif, qui peut être produit par des cultures starter en babeurre et dans le lait fermenté mène au développement du « green » qui est un défaut de saveur. Sous la réfrigération, *Leuconostoc* peut réduire l'acétaldéhyde en éthanol, l'activité étant maximale pour *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* (Vedamuthu, 1994;

Cogan et Jordan, de 1994), en revanche le niveau élevé du sel et la basse activité de l'eau dans le fromage à pH bas, réduisent le métabolisme d'acétaldéhyde chez cette même espèce (Liu *et al.*, 1997).

9. 2. Rôles en nourritures fonctionnelles

Un aliment fonctionnel comporte un composant qui a pour but de favoriser la santé ou important pour empêcher une maladie, en général, le terme est employé pour indiquer un aliment qui contient quelques facteurs de santé (Health-promoting) au delà des aliments traditionnels. Ceci inclut l'addition du probiotique dans des aliments et la production des métabolites bénéfiques pour la santé (Ouwehand *et al.*, 2003).

9. 2. 1. L'effet probiotique du *Leuconostoc* :

Comme quelques micro-organismes actuellement proposés aux consommateurs, *Leuconostoc* peuvent être considérés comme des bactéries probiotiques ces dernières peuvent être décrites comme étant « un supplément alimentaire microbien qui peut affecter favorablement l'animal hôte en améliorant sa flore intestinale » (Roy, 1996) Les produits contenant ces bactéries probiotiques peuvent avoir un effet prophylactique ou thérapeutique sur la santé. Récemment, des études de la praticabilité du contrôle de diarrhée chez des enfants consommant du lait fermenté contenant 10^8 g^{-1} de *Lc. lactis* et de *Ln. mesenteroides* ont indiquées la réduction de la durée moyenne de cette diarrhée (Agarwal et Bhasin, 2002).

9.2. 2. Production des polysaccharides et l'effet prébiotique:

Certaines souches de *Leuconostoc* qui appartenant aux espèces de *Ln. mesenteroides* sont capables de produire des exopolysaccharides (EPS), qui sont des homopolysaccharides composant d'un α -D- glucane ; tels que le dextrane qui est lui-même principalement composé de résidus de α -1,6 lié avec des degrés variables (spécifique de la souche). La production du dextrane exige la présence du saccharose sous l'action d'une enzyme d'induction la dextrane-sucrase. La glycosyltransferase spécifique est également impliquée dans le processus de la biosynthèse du dextrane

(Monchois, *et al.*, 1999). Ce caractère a fait l'objet de plusieurs études ; huit gènes codants pour glucane-sucrase chez *Ln. mesenteroides* ont été identifiés et clonés par Bozonnet *et al.*, (2002). Le gène codant la dextransucrase DsrD a été efficacement exprimé et sécrété dans une cellule donatrice hétérologue (*Lc.lactis* MG1363) et peuvent conduire à la synthèse de dextrane. Récemment, le gène d'une inulosucrase chez une espèce de *Ln. citreum* a été cloné, séquencé et exprimé chez *E. coli*. Les inulosucrases bactériennes, codant pour la production de l'inuline, ont été seulement rapportés chez des mutants de *Streptococcus* et chez *Lb. Reuteri* (Olivares-Illana, *et al.*, 2003).

En technologie laitière, le dextrane, comme toutes les autres EPS, sont employées comme des additifs alimentaires, comme des agents de texture en augmentant la viscosité, et comme stabilisateurs en renforçant la rigidité du réseau de caséine en liant les bandes hydrogène de l'eau en agissant avec les constituants de lait. Par conséquent, les EPS diminuent la synérèse et améliorent la stabilité de produit. Ils jouent un rôle intéressant dans la fabrication du lait fermenté, les crèmes, et le lait aromatisé (Cooke, *et al.*, 2002).

En plus des avantages technologiques, certains EPS sont prétendus avoir des effets physiologiques bénéfiques sur le consommateur. On suppose que la plus grande viscosité d'EPS contenue dans les aliments peut augmenter le temps de séjour du lait fermenté ingéré dans le tractus gastro-intestinal et donc peuvent être bénéfique pour la colonisation du transit intestinal par les bactéries probiotiques (German *et al.*, 1999).

Les leuconostocs ont été proposés comme agent prébiotique pour stimuler la croissance des bactéries bénéfiques utiles dans le tube digestif du nouveau-né (Djouzi *et al.*, 1995) et il a été prouvé que les α -gluco-oligosaccharides produits par les *Ln. mesenteroides* NRRL-B-18242 sont fortement résistantes à l'attaque des enzymes digestives.

9. 2. 3 Production de mannitol

Le mannitol est un sucre à basse calories qui pourrait remplacer le saccharose, le lactose, le glucose ou le fructose dans des produits alimentaires. Il est métabolisé indépendamment de l'insuline et est également applicable dans les produits alimentaires diabétiques. Les espèces appartenant au *Ln. pseudo-mesenteroides* et *Ln. mesenteroides* sont connues par leur capacité à produire le mannitol dans la fermentation du fructose. (Von Weymarn, *et al.*, 2002).

9. 2.4. Hydrolyse des α -galactosides

Les α -galactosides tels que le stachyose et le raffinose qui sont généralement présents dans les plantes (soja, maïs...) sont des composants non métabolisés par les être humains ni les animaux à cause de l'absence de l' α -galactosidase dans la muqueuse intestinale de ces être vivants, ce qui peut entraîner un ballonnement. Pour surmonter ces inconvénients et pour amplifier la consommation de ces composants, plusieurs travaux ont été réalisés afin d'éliminer les α -galactosides en utilisant des méthodes physiques ou par l'utilisation des enzymes spécifiques (α -galactosidase). En dépit de la capacité du *Leuconostoc* de fermenter l' α -galactosides (Prévost *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1994) les propositions et les tentatives à employer l' α -galactosidase des *Ln. mesenteroides* comme approche biotechnologique pour métaboliser les α -galactosides, sont toujours au cœur de la recherche et ne sont pas encore bien définies (Huang *et al.*, 1994).

9. 2. 5. Production des vitamines

Des souches de *Ln. mesenteroides* produisant des quantités significatives de ménaquinones ont été caractérisées, ces souches seraient proposées comme cultures starters dans la fermentation des aliments d'origine laitière (et autre) ou des suppléments diététiques empêchant les maladies d'insuffisance de vitamine. Récemment, la production de la vitamine B9 a été rapportée chez *Ln. lactis* et les espèces de *Ln. paramesenteroides* (Sybesma, *et al.*, 2003).

10. *Leuconostoc* et l'interaction microbienne

Les levains mésophiles de BL (Bactérie lactique) utilisés dans l'industrie laitière sont des mélanges des genres, des espèces, des souches et même des différentes variétés. Leur composition n'est pas toujours connue ainsi, en particulier dans le cas des levains naturels. Dans l'addition, les interactions microbiennes, sont soit bénéfiques (coopération) ou antagoniste (inhibition) et peuvent mener aux changements incontrôlables de la composition des levains (Juillard *et al.*, 1998). Les interactions positives peuvent avoir comme conséquence une stimulation de la croissance ou une

meilleure production de métabolite. Elles sont soit directe, comportant les contacts physiques des individus ou indirect, dus à la modification des substrats ou des paramètres du milieu. Les interactions négatives peuvent aussi être soit directes où les bactériophages sont impliqués ou elles pourraient être aussi indirectes par la sécrétion des métabolites toxiques ou antimicrobiens et la concurrence vis-à-vis de la consommation d'un substrat. *Leuconostoc*, y compris les bactéries lactiques sont très connues par la production d'une variété de composés antimicrobiens, tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, le diacétyl et les bactériocines. (Ozlem Osmanagaoglu.,2007)

10.1. Réactions de Co-agrégation

Le matériel extracellulaire isolé de *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* ATTC 663 a montré que l'interaction physique avec des cellules de *Lactococcus* cause une Co-agrégation (Gopal et al., 1996). Ceci peut faciliter les interactions et (ou) la Co-culture pendant la fabrication de fromage.

10. 2. Croissance du *Leuconostoc* en cultures mixtes :

Les souches de *Leuconostoc* se développent bien en communauté avec les *Lactococcus* productrice d'acide et leur croissance en culture mixte a été étudiée en se basant sur le métabolisme du citrate et la formation d'arome. Ce phénomène a été décrit comme une synergie (Jordan et Cogan, 1995). Les leuconostocs métabolisent le citrate à un pH de 6,3 à 4,5, et produisent le diacétyl et l'acétoïne seulement dans des conditions acides, ainsi, pour lancer le métabolisme du citrate et pour produire des composés aromatiques, une production suffisante d'acide par *Lc. lactis* est exigée pour diminuer le pH en milieu lait (Cogan et Jordan, 1995).

Moins d'attention a été consacrée au taux de croissance, la production d'acide et la biomasse finale de ces bactéries, qui reflètent également l'interaction qui se produit dans les cultures mixtes de *Leuconostoc* et du *Lactococcus*, la croissance de *Leuconostoc* était soit stable soit elle a été inhibé pendant la phase exponentielle et systématiquement dans la phase stationnaire (Vedamuthu, 1994; Bellengier et al., 1997). L'inhibition a été habituellement supprimée par l'addition des peptides ou des acides aminés, prouvant que la concurrence pour les nutriments azotés est un dispositif

général de culture mixte du *Leuconostoc* et *Lactococcus* en milieu lait (Bellengier et al., 1997). Il faut noter que lorsque la concentration des besoins azotés est à l'extrême, le comportement des souches de *Ln. mesenteroides* désavantage souvent les *Lc. lactis* (Foucaud et al., 2001; Gendrot et al., 2002), et que l'addition de ces composées peut même entraîner chez certaines souches des phénomènes d'inhibition de la croissance. En revanche, la croissance maximale améliorée de *Ln. lactis* CNRZ 1091 dans les cultures mixtes avec le *Lc. lactis* subsp. *cremoris* AM2 en milieu lait a illustré une bonne coopération entre ces deux espèces. Les différents types d'interactions peuvent se produire selon les souches utilisées dans les cultures mixtes dans le lait mais aussi sur la température de croissance. Une croissance élevée des espèces se produit pendant l'incubation entre 21°C et 25°C. À une température un peu plus (au-dessus de 25°C), le rapport métabolique devient plus actif. *Lc. lactis*, se développe à une vitesse plus rapide à une température plus élevée (entre 25°C et 32°C) relativement par rapport au *Leuconostoc* (Liu et al., 1997 ; Barrette et al., 2000).

10. 3. La production d'acide organique

Le mécanisme par lequel *Leuconostoc* empêche la croissance d'autre genre de bactérie lactique ainsi que les bactéries pathogènes a été également attribué aux produits issus de la dégradation d'hydrate de carbone et de citrate (Caplice et Fitzgerald, 1999). L'effet antimicrobien des acides, y compris les acides lactiques et acétiques, affectent les propriétés de la membrane cytoplasmique : telles que le potentiel de la membrane et l'intégrité de la cellule (Cabo, et al., 2002). Il faut noter que l'acide acétique est plus toxique que l'acide lactique, en milieu faiblement tamponnée, les deux acides agissent en synergie : l'acide lactique contribue à diminuer le pH du milieu, augmentant ainsi la toxicité de l'acide acétique.

D'autres produits du catabolisme manifestent un pouvoir inhibiteur : Jan et Gill (1982) ont montré que le CO₂ inhibe certains décarboxylases. Les propriétés antibactériennes du diacétyle ou de l'éthanol ont été également décrites, bien que leurs effets soient légers dans des fermentations lactiques habituelles (Drosinos et al., 2006). Dans la présence de l'oxygène, *Leuconostoc* accumule le peroxyde d'hydrogène qui pourrait être inhibiteur à quelques micro-organismes (Condon, 1987). Cette

accumulation résulte un déséquilibre entre les systèmes de dégradation et de synthèse. (De vuyst et Degeest, 1999).

10.4. Les Bactériophages du leuconostoc :

L'absence des rapports indiquant des problèmes dans l'industrie laitière liée aux bactériophages des leuconostocs peut expliquer la rareté des études sur de tels bactériophages. En plus, la croissance lente des souches de *Leuconostoc* dans les levains des cultures mixtes pourrait également expliquer la difficulté rencontrée pour identifier ces bactériophages dans les fermentations qui se caractérisent par une production normale d'acide. Cependant, des bactériophages actifs contre le *Leuconostoc* ont été isolés dans les produits laitiers (des échantillons de petit lait, le fromage, etc.). Ces bactériophages appartiennent à la famille de *Siphoviridae* (Dessart et Steenson, 1995; Ackermann, 2001).

10.5. Les bactériocines produites par *Leuconostoc*

Selon Jack *et al.*, 1995 « Les bactériocine sont des molécules de nature protéique, synthétisées par la voie ribosomique, sécrétées dans le milieu extracellulaire et douée d'une activité bactéricide dirigée essentiellement contre des espèces taxonomiquement proche de l'organisme producteur ».

Ces peptides antimicrobiens sont des composants essentiels du système immunitaire naturel des cellules vivantes, elles sont capables d'empêcher à de petites concentrations la croissance des bactéries indésirables, telles que les micro-organismes de détérioration et certaines bactéries pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* etc.) transmises par les aliments (Osmanagaoglu.,2007)

Peu de rapports existent sur l'action antimicrobienne de *Leuconostoc* contre les micro-organismes de détérioration et les bactéries pathogènes, dans lesquels l'activité inhibitrice est attribuée à une bactériocine (Stiles, 1994). Les études qui sont anciennes ou préliminaires, étaient limitées dans l'isolement des souches productrices des substances antibactériennes, et leurs caractérisations inachevées (Fantuzzi *et al.*, 1999; Brashears *et al.*, 2003; Pepe *et al.*, 2003).

Les bactériocines produites par les souches de *Leuconostoc* appartiennent aux bactériocines de la sous-classe IIa comme « les pediocine » : petits peptides non-modifiés thermostables, et actifs contre *Listeria* (Ennahar, *et al.*, 2000). La mesentericine Y105 et B105 et la mesenterocine 52A et 52B des *Leuconostoc* ont été intensivement décrits et leur activité biologiques, ainsi que leurs structure et leurs propriétés ont été analysées (Corbier, *et al.*, 2001; Morisset et Frère, 2002). Les gènes structuraux de La mesentericine Y105 et B105, la mesY et la mes B respectivement ont été clonés par plusieurs chercheurs (Hécharde *et al.*, 1999 ; Castano *et al.*, 2005). L'action de la Mesentericine Y105 a été mise en évidence par cytométrie en flux (CMF), cette technique a permis de suivre en direct une co-culture de *Leuconostoc mesenteroides* Y105 et de *Listeria monocytogenes* (Hécharde *et al.*, 1992) ou le dénombrement pour chaque bactérie a montré une dominance rapide de *Leuconostoc mesenteroides* Y105, la mesentericine Y105 semble avoir une action spécifique contre *Listeria monocytogenes*. Castano *et al.*, (2005) ont ainsi confirmé cette propriété et ils ont rapporté que cette bactériocine est constitué par 37 résidus et réticulé, par un pont en bisulfure. La leucocine H (Blom *et al.*, 1999) et la dextranicine 24 (Revol-Junelles et Lefebvre, 1996) ont été ainsi décrites comme des bactériocines produites par *Leuconostoc*.

La leucocine J produite par Ln.sp.J2 possède un spectre d'activité plus vaste, hormis les bactéries lactiques, elle inhibe aussi un grand groupe de bactéries pathogènes : *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* et *Yersinia enterocolitica*.

Les différents mécanismes, y compris la composition de la membrane en acide gras ou en protéine putative d'immunité, induisent des phénomènes de résistance aux bactériocines chez les leuconostocs (Limonet, *et al.*, 2002).

Bien que les bactériocines produites par *Leuconostoc* d'origine laitière (la mesentericin Y105) soient étudiées pour leur usage possible dans la conservation des aliments, l'addition d'une bactériocine produite par des leuconostocs dans les aliments n'a été jamais rapportée. En effet, pour l'efficacité optimale contre les aliments contaminé par les bactéries pathogènes et des germes de détérioration, des bactériocines peuvent être employées en tant qu'un système de conservation des aliments, qui implique un ensemble de facteurs antimicrobiens (Ennahar *et al.*, 2000; Cleveland, *et al.*, 2001).

III-Généralité sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*

1. *Staphylococcus aureus*

1.1. Caractéristiques générales :

Appartient à la famille des *Micrococcacea*, germe cocciforme de 0,8 à 1 µm de diamètre, à Gram positif, immobile, acapsulé sauf de très rares souches sont entourées d'une pseudo-capsule asporulé, isolé en diplocoques et le plus souvent en amas ayant l'aspect d'une grappe de raisin (Larpent., 2000). *Staphylococcus aureus* est un germe aéro-anaérobie facultatif, il se cultive très facilement sur tous les milieux usuels à température optimum de 37°C et à pH optimum de 7.5. Il peut aussi se développer entre 10°C et 45°C.

En bouillon, on assiste à un trouble uniforme abondant en 24 heures, avec un dépôt pulvérulent, collerette ou léger voile à surface au bout de 48 heures sans production de pigments (Freney. 2000). Sur gélose, les colonies sont arrondies, de 1 à 2 mm de diamètre, humides, opaques, luisantes et crémeuses à surface lisse et brillante et à bords réguliers, c'est les formes S (smooth). On observe le passage de la forme smooth à la forme R (rough) avec des formes rugueuses qui sont antigéniquement dégradées et moins virulentes. Les souches pathogènes de *Staphylococcus aureus* présentent une activité protéolytique élevée, une catalase active, absence d'oxydase, présence de cytochromes d et e, de coagulase, d'une bêta-lactamase et d'une lipase. D'autres caractères biochimiques se rapportant à ce genre : nitrate réductase, la réaction de Voges-Proskauer (VP) et la coloration au rouge de méthyle ainsi que l'uréase sont tous positifs, présence d'une gélatinase, pas de production du CO₂ dans la fermentation de la plupart des sucres comme le galactose, le glucose, le mannose, le mannitol, le lactose et le saccharose.

Le test d'hémolyse sur gélose au sang est positif, le type d'hémolyse se diffère d'une souche à une autre.

1.2. Toxines staphylococciques et la production de pigments:

La plupart des souches produisent un pigment jaune doré ou jaune citron ; mais certaines donnent des colonies blanches.

Le pigment est produit en présence d'oxygène, de CO₂ et de calcium à une température légèrement inférieure à la température optimale de croissance. Sa production est favorisée par la présence d'acide gras. Ce pigment est soluble dans les solvants des graisses, il est de nature caroténoïdes.

Pour s'adapter aux conditions du milieu à l'intérieur d'un hôte *Staphylococcus aureus* produit des substances métaboliques de nature protéiques (Les hémolysine et les leucocidines) qui présentent une détermination génétique.

1.3. Le staphylocoque et les intoxications alimentaires :

Staphylococcus aureus est une bactérie pathogène responsable d'une large et divergente gamme des infections chez les êtres humains et les animaux, y compris les intoxications alimentaires. Dans beaucoup de pays, le *Staphylococcus aureus* est considéré le deuxième ou troisième germe pathogène le plus commun causant des manifestations d'intoxication alimentaire, après les salmonelles et le *Clostridium perfringens* (Ananou *et al.*, 2005).

En générale le *Staphylococcus aureus* est effectivement contrôlé à pH 5,3 ou moins dans l'environnement. Par conséquent, une des manières recommandées pour inhiber sa croissance dans les produits fermentés est l'addition des bactéries lactiques à la formulation, pour réaliser ce pH en un intervalle court de temps (Sameshima *et al.*, 1998). Cependant, il semble que les métabolites bactériens comme les acides lactiques et acétiques ainsi que la production de bactériocine sont les responsables majeurs de l'inhibition de cette bactérie, plutôt que le pH bas lui-même. En fait quand le pH est ajusté avec de l'acide chlorhydrique, on ne pourra pas observer l'inhibition de *Staphylococcus aureus*. Néanmoins, la persistance et/ou le développement de ce germe en produit fermentés avec des valeurs de pH inférieures à 5 comme le yaourt a été rapportée fréquemment (Ananou *et al.*, 2005).

L'utilisation potentielle des inhibiteurs additionnels à bas pH, tel que des bactéries lactiques avec l'activité anti-staphylococcique, est étudiée (en les employant seul ou en combinaison avec d'autres agents physiques ou chimiques) pour le bio-contrôle de ce microbe pathogène en alimentation (Thomas *et al.*, 2000).

Contrairement aux autres staphylocoques communs, *Staphylococcus aureus* produit une **coagulase** ; une enzyme responsable de la coagulation du sang. Les types de croissance sur gélose au sang servent aussi à identifier ces staphylocoques. Récemment, on a déterminé la structure de l'α-hémolysine staphylococcique. La toxine lyse les cellules en formant dans sa

membrane plasmique, des canaux où s'engouffre le solvant. Les monomères de toxine, solubles dans l'eau, se fixent à la surface de la cellule et s'associent entre eux pour former des pores. Ces canaux hydrophiles offrent un passage libre à l'eau, aux ions et aux petites molécules. *S. aureus* se développe généralement sur les muqueuses nasales et peau ; on le trouve aussi dans les appareils gastro-intestinal et urinaire des animaux à sang chaud.

2. *Bacillus cereus*

2.1. Caractéristiques générales :

Appartient à la famille des *Bacillaceae*, les bactéries de ce genre habituellement font partis de la flore de l'environnement et ne sont pas souvent impliqués en pathologie humaine, en revanche il est actuellement bien établi que certaines espèces de ce genre peuvent causer des toxi-infections alimentaires chez l'homme. *Bacillus cereus* est la principale espèce incriminée, ces germes se présentent sous forme de bâtonnets à Gram positif donnant des spores thermorésistants et généralement mobiles. Ce sont des bactéries aéro-anaérobie ou aérobies stricts, possèdent une catalase mais dépourvue d'oxydase, *Bacillus cereus* ne fermente pas le mannitol mais possède une phospholipase très active (Bourgeois *et al.*, 1996)

2.2. Pouvoir pathogène :

Bacillus cereus peut contaminer plusieurs aliments d'origine végétale ou animale par la production des spores qui restent viables et donnent des formes végétatives au germe en cas d'une courte cuisson, la multiplication de la bactérie se fait à une température de 15°C à 50°C et sécrète une entérotoxine qui provoque des symptômes diarrhéiques (Gaillard, 1989)

Les toxi-infections alimentaires dues à *Bacillus cereus* se représentent près de 5% des cas de toxi-infection alimentaires dans certaines statistiques anglo-saxonnes, et peuvent être observés dans deux formes :- Dans le 1^{er} aspect, la période d'incubation est de 8h à 10h avec une diarrhée persistante comme symptôme principal.- Dans le second aspect, la période d'incubation est un peu moins, sa durée est de 1h à 5h, et les symptômes principaux sont des vomissements et l'absence de la fièvre (Turnubull *et al.*, 1973).

L'objectif de ce mémoire est de mettre en évidence les interactions microbiennes entre les espèces de *Leuconostoc mesenteroides* et ces bactéries pathogènes dans le but d'une bonne bio-préservation des aliments ainsi pour lutter contre les intoxications alimentaires en Algérie.

Matériel et méthodes

1. Prélèvement et collection des échantillons :

Les souches de *Leuconostoc* utilisées dans notre étude ont été isolées à partir de deux biotopes différents : des échantillons du lait cru de chèvre notamment du fromage de Roquefort ; avec l'emploi de quelque souche pathogène fournie par le laboratoire de microbiologie appliquée de l'université d'Oran.

Le tableau suivant donne les codes utilisés pour la nomenclature des souches ayant été utilisées comme indicatrices (Souches pathogènes) qui sont des souches référenciées et Gram+:

Le tableau 2 : donne les codes utilisés pour la nomenclature des souches ayant été utilisées comme indicatrices (Souches pathogènes).

Souche	Code	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	St	Laboratoire central de microbiologie du CHUO
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	Bc	Souche lyophilisée

1.1. Les échantillons des laits de chèvre :

1.1.1. Provenances des échantillons :

Trois échantillons de lait crus de chèvres ont été collectés à partir de trois animaux différents dans deux fermes de la région ouest d'Algérie (Oran, Tiaret), cette diversité à pour but d'obtenir une collection de souche appartenant à des espèces lactiques différentes.

1.1.2. Collecte du lait :

Le lait cru doit être traité avec un grand soin afin d'éviter toute risque de contamination qui peut influencer sur la flore lactique et donc les leuconostocs et ceci par la réalisation du prélèvement dans des conditions aseptiques en lavant les mamelles de la chèvre et l'endroit avec de l'eau savonneuse et la collecte du lait doit se faire dès le premier jet dans des flacons stériles qui sont transportés à 4 °C au laboratoire.

1.1.3. Mesure de l'acidité Dornic et le pH des échantillons :

L'acidité Dornic et le pH de chaque échantillon du lait doivent être mesurés par titrimétrie et par le pH-mètre.

1.2. Les échantillons du fromage de Roquefort :

Trois échantillons de fromage ont été utilisés pour isoler les espèces de *Leuconostoc*:

- R1 Fromage bleu Danois «Danemark ».
- R2 Bergader « Allemagne».
- R3 Société Roquefort « France ».

2. Isolement et purification des souches de *Leuconostoc* :

2.1. Milieux de culture et d'isolement :

Nous avons employé dans notre étude des milieux de cultures sélectifs pour les *Leuconostoc* afin d'inhiber et ralentir la croissance des autres genres de bactéries lactiques :

-Milieu MRS (De Man Rogosa et Sharpe 1960) additionné à un antibiotique la vancomycine à raison de 30µg/ml dont la plus part des bactéries lactiques sont sensibles a cette dose.

-Milieu MSE (Mayeu, Sandine et Elliker 1962). Badis et al .,2005

Sur lesquelles les espèces de *Leuconostoc* produisent des colonies de forme spéciale.

2.2. Traitement des échantillons :

2.2.1. Du lait de chèvre :

-On réalise à partir de chaque échantillon du lait de chèvre des dilutions décimales jusqu'à 10^{-8} dans de l'eau peptonée.

-On prélève à partir des trois dernières dilutions 1 ml qu'on ensemence en profondeur dans des boites de Pétrie contenant du MSE ou MRSv .

2.2.2. Du fromage Roquefort :

Une quantité de 1 g de chaque échantillon de fromage du Roquefort est broyée avec 9 ml d'eau physiologique stérile. Après agitation au vortex jusqu'à l'homogénéité, des dilutions

décimales jusqu'à 10^{-6} sont réalisées. 1ml des trois dernières dilutions est prélevé et ensemencé en profondeur dans le milieu MRSv et MSE (Badis *et al.*, 2005).

Toutes les boîtes sont incubées en anaérobiose à 30°C pendant 48h à 72h (Mathot *et al.*, 1993 ; Khedid *et al.*, 2006).

2.3. Isolement et purification :

L'isolement des bactéries lactiques suspect *Leuconostoc* a été fait à partir des boîtes de pétrie contenant un nombre de colonies compris entre 25 et 250, réalisé selon les méthodes décrites par la Fédération internationale du Lait.

La purification des bactéries isolées a été établie par la réalisation des subcultures sur bouillon et milieu MRS agar jusqu'à l'obtention de colonies bien distinctes et homogènes. La pureté des souches est vérifiée par l'étude microscopique et les *Leuconostocs* seront identifiés selon les tests classiques (Mathot *et al.*, 1994, Kihal 1996 et Kihal *et al.*, 1996).

3. Identification et caractérisation des souches :

Les isolats ont été caractérisés selon plusieurs méthodes de façon à mettre en évidence la diversité phénotypique de la collection (Carr *et al.*, 2002).

3.1. Test phénotypique

3.1.1. Examen macroscopique :

Les cultures obtenues sur boîte de Pétrie sont observées à l'œil nu pour caractériser la forme, la taille et l'aspect ainsi que la couleur des colonies (Badis *et al.*, 2006).

En effet, les colonies des *Leuconostoc* dépendent généralement du critère morphologique suivant :

- Colonies transparentes très petites.
- Un diamètre compris entre 0,5 et 1 mm
- Un contour régulier.
- Une forme circulaire lisse sur MRS et gluante et visqueuse sur milieu MSE.

3.1.2. Examen microscopique :

Il s'agit d'observer la morphologie cellulaire et le type d'association par la coloration de Gram. L'observation microscopique renseigne sur la forme et la disposition des cellules bactérienne et détermine ainsi le Gram. La sélection les bactéries lactiques suspectes

Leuconostoc se fasse sur l'aspect cellulaire qui sont des cocci ovoïdes et se regroupe en paire et en chaînette (Rodolphe *et al.*, 2002 ; Khedid *et al.*, 2006). Les isolats sont tous Gram positive.

3.1.3. La catalase :

La catalase est une enzyme respiratoire qui permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène :



La recherche de la catalase se fait par la mise en contact d'une colonie bien isolée avec une goutte d'eau oxygéné ; un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygéné sous l'action de la catalase (Guiraud, 1998).

NB : Les bactéries présentes une réaction positive à la coloration Gram et dénuée d'activité catalase et asporulé ont été retenus.

3.2. Test physiologique et conservation des souches

3.2.1. Croissance en milieu hypersalé :

L'habilité des souches à croître dans un milieu hypersalé est testé en bouillon MRS à 6,5 % de chlorure de sodium (NaCl), comme témoin en utilise milieu MRS dépourvue de NaCl. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 5 jours (Guessas et Kihal, 2004). La croissance des bactéries est appréciée par l'apparition d'un trouble dans les tubes (Leveau et Bouix ,1980).

3.2.2. Croissance à pH 9,6 :

Ce test est effectué en inoculant un bouillon MRS dont le pH est porté à 9,6 par des pré-cultures de 18h des souches pures. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24 à 48h. Présence du trouble signifie un résultat positif (présence de croissance).

3.2.3. Croissance à différente température :

Des cultures sont ensemencées sur bouillon MRS et incubées pendant 5 jours et sont incubées à des températures différentes 15 °C ,37°C et 45°C (Guessas et Kihal, 2004)

La croissance est exprimée par le trouble du milieu et l'apparition du dépôt au fond du tube.

3.2.4. Test de thermorésistance :

Des pré-cultures de 18h sont soumises à une température de 63°C pendant 30min puis incubée à 30°C pendant 24h.

3.2.5. Conservation des souches :

-Conservation à court terme : Des souches pures cultivées sur MRS incliné sont conservées à 4° C.

-Conservation à long terme : Le culot bactérien d'une culture en phase exponentiel est conservé à -20°C dans de lait écrémé additionné du glycérol à 30%.Au fur et à mesure des besoins les souches sont décongelée rapidement et repiquées dans du lait écrémée avant chaque utilisation (Samelis et *al.*, 1994).

3.3. Test biochimique :

3.3.1. Production de dextrane :

La capacité des leuconostocs de produire cette exopolysaccharide rend ce test important pour leur identification au niveau de l'espèce (Ignacio Sanchez et *al.*, 2005). On réalise des ensemencements sur milieu MSE de Mayeux et *al.*, (1962), par des pré-culture de 18h puis on incube à 30°C pendant 24 à 48 h

Les souches dextranigène sont caractérisées par la formation des colonies gluantes.

3.3.2. Recherche de l'arginine hydrolase (ADH) :

Ce test est très important pour différencier les leuconostocs des lactobacilles hétérofermentaire (Moulay et *al.*, 2006). Des cultures jeunes des souches sont ensemencées sur milieu M16BCP (Thomas, 1973) et sont incubée à 30 °C pendant 24 à 48 h.

Les souches dites ADH négatif virent la couleur du milieu au jaune qui signifie la dégradation du glucose par contre le catabolisme de l'arginine et la libération de l'ammoniac (NH₃) neutralisent l'acidité et garde la couleur stable du milieu violette.

3.3.3. L'utilisation du citrate :

La dégradation du citrate se fait grâce à la citratase, il s'agit d'une enzyme qui existe dans certaines espèces de *Leuconostoc* donc la recherche de la citratase oriente l'identification des espèces. Sa mise en évidence se fait par la réalisation d'une culture sur milieu Kempler et Mc Kay (1980) (Kihal et al., 1996 ; Moulay *et al.*, 2006).

3.3.4. Recherche du type fermentaire :

Ce test permet d'apprécier la nature de la fermentation des substrat carboné le type du métabolisme (homoférentaire ou hétéroférentaire).

Un bouillon MRS contient une cloche de durham est inoculé par une culture jeune de la souche à testé et incubé pendant 24h à 48h à une température de 30°C.

Il faut se rappeler que les leuconostocs sont tous productrice de CO₂ (hétéroférentaire), donc ce test est un caractère de base pour leurs identifications.

3.3.5. Métabolisme des sucres :

Ce test permet de connaître l'aptitude des bactéries à utilisées certains sucres. Le milieu approprié à cette étude est également du bouillon MRS contenant le pourpre de bromocrésol (0.04 g/l) comme indicateur de pH et additionné avec 1% de différents sucres ou chaque souche est repiquée dans différents tubes selon la méthode décrite par Stiles *et al.*, (1997) :

Des cultures e phase exponentiel de nos souches sont repartis dans des epindorfs à un volume de 2ml puis on centrifuge à une vitesse de 5000 tours pendant 5min, on garde le culot et on le lave avec de l'eau physiologique pour éliminer toute marque de milieu puis on centrifuge une seconde fois ensuite on ajoute au culot bactérien 2ml de MRS BCP. Les tubes ont été agités pour homogénéiser le mélange.

On répartit dans des tube stériles les sucres utilisée à raison de 100µl /ml de milieu (MRS BCP) dont on ajoute 100µl de chaque souche.

La lecture se fait après 24 à 48 h jusqu'à 72h d'incubation à 30°C.

Le virage de la couleur du milieu du violet au jaune explique un résultat positif. Les sucres utilisés sont : Lactose, Galactose, Fructose, Arabinose, Raffinose, Mannose, Mannitol, Maltose, Xylose , Cellobiose , Sucrose , Ribose , Cellulose, Melibiose.

4. Test biotechnologique

4.1. Mesure de la production de l'acide lactique :

La production de l'acide lactique par les bactéries lactiques indique leurs croissances et provoque la coagulation du lait d'autre part et la diminution du pH. Le suivi du pouvoir acidifiant et de la réduction du lait par nos souches a été réalisé par l'enregistrement en continue du pH et de l'acidité Dornic dans un intervalle de temps régulier tous les deux heures.

On a réalisé des cultures dans 3 ml d'une préculture ensemencer dans 10ml de lait écrémé a été transvasés dans un flacon de 100ml de lait écrémé.

Le contenu du flacon a été répartie dans des tubes stériles à raison de 10ml par tubes.

Le tout est incubé à 30°C pour la mesure du pH et de l'acidité Dornic selon les temps suivant : 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 16 h, 18 h et 24 h.

A chaque mesure on transfère le contenu du tube dans un bécher auquel on ajoute 5 goutte de phénolphtaléine (composition 2g dans 100 ml éthanol 90%) puis on procède au mesure de l'acidité par le titrage de la culture sous agitation avec de la soude (1/9 N) jusqu'au pH7 qu'on décèle par un virage à la couleur rose pale qui doit persister 10s au moins, à cet instant, on note le volume de la soude versée, nécessaire à l'équilibre de l'acidité produite.

La quantité de l'acide lactique produite est calculée selon la relation suivante :

$1^{\circ}D = 0,1g/l$ d'acide lactique.

$Acidité = V_{NaOH} \times 10$

V_{NaOH} : Volume de la soude coulé.

4.2. Etude du pouvoir inhibiteur :

Pour tester la capacité de nos souches de produire une substance antimicrobienne nous avons adopté la méthode de Fleming et al 1975 et c'est la méthode la plus intéressante selon la littérature et aboutis à des résultats qualitatifs et quantitatifs. La mise en évidence de la production de substances antimicrobiennes par nos souches à été réalisée en deux grandes étapes :

-Dans la première étape, on a détecté les inhibitions qui existent entre différents couples de des isolats de *Leuconostoc* et des bactéries indicatrice (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*).

-Dans la seconde étape, on a déterminé la nature de l'agent inhibiteur.

4.2.1. Recherche d'inhibition :

Des souches en phase exponentielle de croissance considérées comme inhibitrices sont ensemencées en touche par un multipoint à la surface du milieu MRS gélifié, après séchage des dépôts on incube 24 h à 30°C.

On note la croissance des souches et en semence en masse avec 7ml de la gélose molle à 0,7% d'agar contenant 500 µl d'une culture jeune de la souche considérée comme indicatrice (sensible). On laisse solidifier le milieu puis on incube à 30°C /24h. La lecture des résultats consiste à déterminer la présence des halos clairs au niveau de chaque souche ensemencée en touche et la mesure de leur diamètre (Tagg et Mc Given, 1971).

4.2.2. La détection de la nature de l'agent inhibiteur :

L'inhibition produite par les souches inhibitrices peut être due à une lysogénie spontanée, production d'acide organique, ou à la synthèse d'une bactériocine (Achemchem *et al.*, 2004), ces derniers sont des substances de nature protéique étant connus pour leur thermostabilité (Labioui *et al.*, 2005), dans le but de caractériser l'agent responsable des inhibitions observées on a réalisé les tests suivants :

Recherche de phage :

On découpe avec une pipette pasteur un fragment de gélose dans la zone d'inhibition que l'on ajoute à 1ml de milieu stérile contenant 50µl de chloroforme

(Le chloroforme a pour but de tuer les bactéries prélevées avec la gélose).

Après agitation on laisse décanter puis on ajoute à 7ml de gélose molle contenant la souche indicatrice une quantité de 300µl de milieu. Le tout est coulé stérilement dans une boîte de pétri contenant de la gélose (double couche).

Après incubation à 30°C /24h, on note la présence ou l'absence des plages de lyse qui indiquent la présence de phage.

Production d'acide organique :

L'influence du pH de milieu sur le développement des souches indicatrice à été détecté sur milieu MRS tamponné à pH 7 avec un tampon phosphate (100 mM) préparé selon Sambrook *et al.*, (1986). Le protocole expérimental suivi est celui de la technique de la double couche, on compare les résultats au témoin non tamponné.

Recherche de bactériocine.

Pour s'assurer de la nature protéique des substances inhibitrices nous avons utilisé des enzymes protéolytiques, la trypsine et l' α -chymotrypsine. Le protocole expérimental suivis est celui de la diffusion en puits :

La solution enzymatique est d'abord préparer dans des tampons phosphate de sodium (100 mM; pH 7) puis filtré à l'aide des filtre millipores (0,45 μ m)

A partir des précultures de 18h dans du bouillon MRS on réalise des centrifugations (8000 t/min pendant 15 min,). On récupère un volume de 500 μ l de surnageant auquel on additionne 250 μ l de chaque enzyme, on incube pendant 2h à 37°C et on expose le reste du surnageant à un chauffage de 100°C pendant 15 et 30min.

On réalise des ensemencements en masse à partir des cultures jeunes de la souche indicatrice *Staphylococcus aureus* dans milieu MH agar à raison de 500 μ l /10ml de milieu, dès la

solidification on creuse 4 puits à l'aide d'une pipete pasteur et on réalise des dépôts comme suit sur deux boite pétri à la fois:

1-Le culot bactérien

2-Surnageant bactérien non traité

3-Surnageant bactérien +trypsine

4-Surnageant bactérien + α -chymotrypsine

On réalise ainsi les dépôts suivants pour confirmer la nature de la substance inhibitrice :

3-Surnageant bactérien +trypsine

4-Surnageant bactérien + α -chymotrypsine

5-Surnageant bactérien à pH 7

6-Surnageant bactérien chauffé (100°C/30min)

Le tout est incubé à 37°C pendant 24 à 48 h après une première incubation à une température ambiante.

4.2.3. Cinétique de croissance et d'acidification en culture pure et mixte:

Même protocole qui a été utilisé précédemment dans la cinétique d'acidification a été utilisé pour mesurer le pH et l'acidité Dornic.

La mesure de la population bactérienne a été réalisée en utilisant la méthode de dénombrement en profondeur sur milieu solide. La souche inhibitrice la plus performante SH20 ainsi que la souche test ont été repiquées de façon routinière dans 10ml de lait écrémé stérile contenant l'extrait de levure et après 18h d'incubation on réalise une série de dilution décimale dans 9ml d'eau physiologique, en semence les dilutions adéquates sur milieu YMA « *Leuconostoc* » et milieu Shapman « *Staphylococcus aureus* », puis on incube à 30°C pendant 24h-96h (Carr *et al.*, 2002).

Deux à trois boîtes sont prises par dilution, on dénombre seulement les boîtes contenant 25 à 250 colonies (Kihal, 1996, Badis *et al.*, 2005)

Résultats et discussions

1. Isolement et purification :

L'utilisation des milieux sélectifs pour la recherche des *Leuconostoc* a été effectuée sur deux milieux différents (MSE et MRSv) qui nous ont permis d'isoler les espèces de *Leuconostoc*. La vancomycine est utilisée comme agent sélectif des *Leuconostoc* à une concentration de 30µg/l qui inhibe les autres espèces de bactéries lactiques. L'isolement a été réalisé en profondeur après incubation à 30 °C pendant 48h. Nous avons obtenu des colonies lenticulaires de petite taille sur MRSv et la production des dextrane a été aussi observée par la formation de colonies muqueuses sur MSE. Cette production de dextrane sur milieu MSE nous oriente dans l'identification de certaines espèces de *Leuconostoc* (Mathot *et al.*,1994). 30 isolats ont répondu à ces critères.

2. Caractéristiques phénotypiques

- Les caractères macroscopiques des cultures pures se présentent sous forme de petites colonies d'environ 1mm de diamètre, rondes transparentes avec un aspect laiteux, avec un contour régulier et de petite dimension sur milieu MRSv solide(**Fig. 4**). En milieu liquide MRS la croissance est observée par un trouble au fond du tube loin de l'oxygène, la partie supérieure est transparente qui montre l'absence de croissance. Un dépôt est aussi observé au fond du tube et son volume opaque avec l'âge de la culture (**Fig. 5**). Par agitation on constate le dégagement du CO₂.

- Les caractères microscopiques : après coloration de Gram et observation microscopique, la pureté des isolats a été constatée et nous a orientés sur l'aspect cellulaire des souches. Ils sont tous gram positif de forme cellulaire ronde, légèrement ovale, sous forme de coccobacilles en paire (diplocoque) et souvent en chaînettes (**Fig. 6**). Ils sont non sporulés et possèdent une capsule.

- Catalase : Ce test montre que tous les isolats sont catalase négative.

Ces caractères phénotypiques nous orientent sur l'appartenance probable des isolats indiquent clairement que les isolats appartiennent aux groupes de bactéries lactiques. La résistance à la vancomycine et le caractère hétérofermentaire par la production de gaz à partir de glucose permet une pré-identification de l'appartenance des isolats au genre *Leuconostoc*.



Figure4 : Aspect des cultures pures des leuconostocs en milieu MRS solide.



Figure 5 : Aspect des cultures pures des leuconostocs en bouillon MRS
(De gauche à droite : Témoin-SH2-SH18)

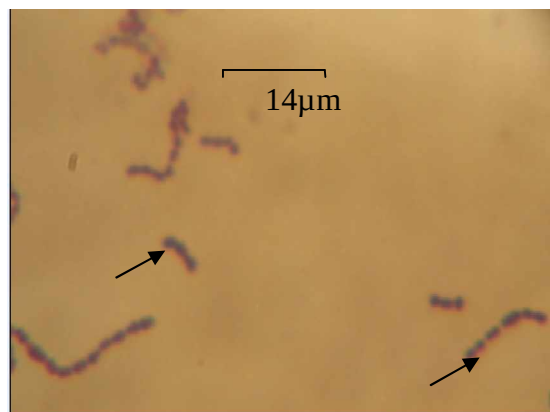


Figure 6 : Observation microscopique des cellules de *Leuconostoc* Gx1250 .

3. Caractéristiques biochimiques et physiologiques :

3.1. Type fermentaire :

La production du CO₂ lors de la fermentation des sucres nous indique que 9 isolats choisis ont révélé un métabolisme hétérofermentaire (**Fig 7**) ce qui caractérise le genre de *Leuconostoc* mais cette probabilité a été confirmée par le test de l'ADH qui est négatif chez les leuconostocs ce qui les différencie des lactobacilles hétérofermentaires (Mathot *et al.* 1994, Badis *et al.* 2005).



Figure 7. Le caractère hétérofermentaire des leuconostocs par l'apparition du gaz de CO₂ dans la cloche de Durham dans le milieu MRS glucose.

3.2. Hydrolyse de l'arginine :

Les cellules des isolats sont toutes des cocci légèrement ovale, mésophiles, hétérofermentaires et ont montré une incapacité d'hydrolyser l'arginine (**Fig 8**). Les isolats résistent à la vancomycine ce qui conduit à les classer dans le genre de *Leuconostoc* (Carr *et al.*, 2002 ; Khedid *et al.*, 2006).

3.3. Production de dextrane :

Les souches productrices de dextrane sont caractérisées par la formation des colonies larges et gluantes sur milieu MSE (**Fig9**). La production du dextrane a été observée chez les souches SH1, SH4, SH8, SH13 et également SH20. Ce caractère important nous a permis de différencier les espèces de *Leuconostoc* et de supposer leurs appartenance à une des trois espèces de *Leuconostoc* productrices de dextrane (*Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ou *Ln. gelidium*).

Et vue que les isolats sont obtenus à partir du lait cru et du fromage Roquefort l'espèce de *Leuconostoc gelidium* est écartée car son écosystème est les produits carnés (Carr *et al.*, 2002).

3.4. Utilisation du citrate:

Le milieu KMK (Kempler et Mc Kay, 1980) a été utilisé pour la mettre en évidence l'utilisation du citrate, les colonies capables de fermenter le citrate donnent des colonies de couleur bleu (**Fig 10**). Le tableau 3 montre que certaines souches utilisent le citrate et d'autres sont incapables. Cette perte de la capacité d'utiliser le citrate, peut être due à une perte de plasmide codant pour la citrate perméase (Kihal *et al.*, 1996). L'utilisation du citrate est un facteur indispensable de la production des composés aromatiques chez les espèces aromatisantes de *Leuconostoc* dans les produits laitiers (Ignacio Sanchez *et al.*, 2005). Ce caractère peut être variable même chez les souches appartenant à la même espèce (Khedid *et al.*, 2006).

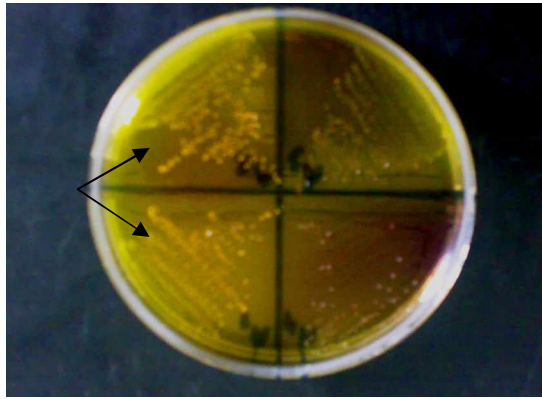


Figure8 : L'aspect des colonies de *Leuconostoc* sur milieu M16BCP

Les fleches indiquent le caractère arginine négatif



Figure 9 :Morphologie des colonies productrices de dextrane
des souches de *Leuconostoc* sur milieu MSE

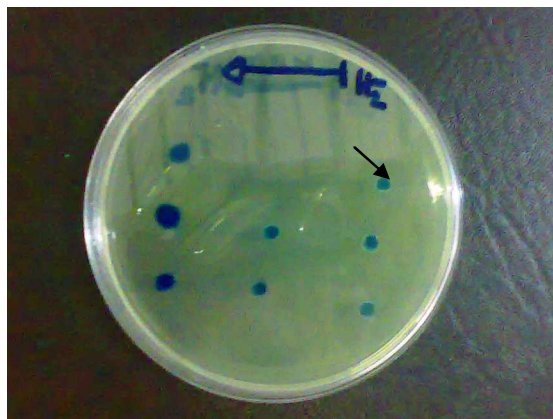


Figure 10 : Recherche de la citratase sur milieu KMK

3.5. Effet du pH de NaCl et de la température d'incubation :

Ces examens physiologiques nous indiquent que sur l'ensemble des souches sélectionnées, une seule souche (SH16) a montré une croissance lente sur MRS à 6,5% de NaCl et l'absence de croissance chez tous les autres isolats dans MRS à pH 9,6 et à température 45°C. Ce résultat confirme que les isolats sont des mésophiles.

L'absence de la croissance à pH 9.6 éloigne nos isolats du genre *Enterococcus* et nous à conduit à supposé que la souche SH16 peut être une espèce de *Leuconostoc pseudomesenteroides* (Tableau 3).

Tableau 3 : Illustre les résultats des caractères phénotypiques des neufs isolats.

	SH1	SH3	SH4	SH8	SH13	SH15	SH16	SH18	SH20
Forme cellulaire	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Regroupement	Ch,Di	Ch	Di	Di	Di	Di,Ch	Ch	DiCh	Di
Dextrane	+	-	+	+	+	-	-	-	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	+	±	-	-	-	+	-	+	-
T°C 15	+	-	+	+	+	+	+	+	+
T°C 37	+	+	+	+	+	-	±	-	+
T°C 45	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 6,5%	-	-	-	-	-	-	+	-	-
pH 9,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) : Réaction positive, (-) : Réaction négative, (Ch) : Chainette, (Di) : Diplocoque

3.6. Le profil fermentaire des sucres :

Pour mieux identifier les isolats au niveau de l'espèce ou de la sous espèce on a établi leur profil fermentaire de quatorze sucres. Le virage de pourpre de bromocrésol utilisé comme un indicateur du pH au jaune révèle l'aptitude des souches à utiliser les différents sucres qui ont été disponible. L'utilisation de ce caractère permet de conclure la pré-identification et de mieux identifier les isolats au niveau de l'espèce.

Tableau 4 : Indique le profil fermentaire des vis-à-vis les quatorze sucres utilisés .

	SH1	SH3	SH4	SH8	SH13	SH15	SH16	SH18	SH20
Lactose	+	-	+	-	-	-	+	±	-
Galactose	+	+	±	+	+	+	±	+	-
Fructose	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Arabinose	+	-	-	-	-	-	±	+	+
Raffinose	+	-	±	+	+	+	+	-	-
Mannose	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Mannitol	±	-	+	+	+	-	-	+	-
Maltose	-	±	+	+	+	-	+	-	-
Xylose	-	-	+	±	+	-	-	+	±
Cellobiose	+	+	+	+	±	-	-	±	±
Sucrose	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Ribose	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Cellulose	-	+	+	+	+	-	+	+	-
Melibiose	-	+	+	+	+	-	-	-	±

-Le profil fermentaire des sucre nous a permis de confirmé la pré-identification de nos isolats en se basant sur des données bibliographique établis par Carr *et al.*,(2002) et Khedid et al.,(2006). La fermentation de l'arabinose et à l'aide du résultat obtenus par le test de la production du dextrane nous ont permis de différencier les sous espèces de *Leuconostoc mesenteroides*, de classer les souches SH1 et SH20 comme *Ln mesenteroides* subsp *mesenteroides* et de confirmer l'appartenance des souches SH4, SH8 et SH13 aux *Ln mesenteroides* subsp *dextranicum*.

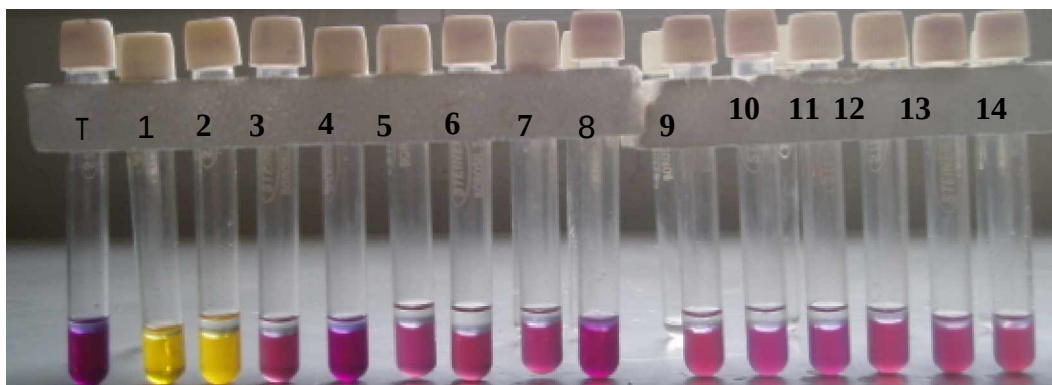


Figure 11: Le profil fermentaire des sucres de la souche de *Leuconostoc* SH15

T -Témoin ,1- Lactose, 2- Galactose, 3-Fructose, 4-Arabinose , 5- Raffinose , 6-Mannose, 7-Mannitol, 8-Maltose, 9-Xylose, 10- Cellobiose, 11- Sucrose, 12- Ribose , 13-Cellulose, 14- Melibiose.

Au cours de notre étude nous avons pu collecter sur la base des critères phénotypique rapporté par plusieurs auteur (Carr *et al.* , 2002 ; Badis *et al.*,2005 ; Hammes et Hertel, 2006 Khedid *et al.*,2006) neuf souches de leuconostocs dont trois souches ont été isolées du lait crus de chèvre et neufs souches de l'échantillon du fromage R3 auxquelles nous avons attribué les codes suivants :

Tableau 5: Illustre l'appartenance des souches isolées aux espèces les plus proches

Souche	% de fiabilité	Code	Origine
<i>Ln mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	91,66%	SH1	L-ch « Tiaret »
<i>Ln lactis</i>	83,33%	SH3	R3
<i>Ln mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	83%	SH4	L-ch « Oran »
<i>Ln mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	75%	SH8	R3
<i>Ln mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	83,33%	SH13	R3
<i>Ln mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	91,66%	SH15	R3
<i>Ln paramesenteroides</i>	75%	SH16	R3
<i>Ln mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	83,33%	SH18	R3
<i>Ln mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	91,66%	SH20	L-ch « Tiaret »

4. Caractérisations biotechnologiques :

4.1. La cinétique d'acidification :

La production de l'acide lactique a été suivie en fonction du temps en utilisant les cultures pures de souches sélectionnées. Cette activité acidifiante est souvent utilisée dans le choix des souches pour l'industrie laitière.

Le suivi de la quantité d'acide produite et l'évolution du pH dans des conditions mésophiles nous a permis de bien conclure que le temps d'incubation a influencé positivement sur le rendement de nos souches. Nos résultats sont présentés sous forme de diagrammes (**Fig12, Fig13, Fig14**) et les valeurs du pH ainsi que la quantité d'acide lactique produite sont présentés dans les tableaux 6 et 7. De ces résultats on remarque que la quantité d'acide produite change selon le stade de vie de la bactérie, cette différence de production est peut-être expliquée par une déficience dans le système du transport des substances fermentescibles du milieu vers le cytoplasme cellulaire (Albenzino *et al.*, 2001).

-Nous remarquons aussi que la production d'acide lactique chez nos souches était moins importante on explique ceci par leur métabolisme hétérofermentaire et donc produisent d'autres composés organiques tels que l'acide acétique, le glyceraldéhyde, l'éthanol et le CO₂ en plus de l'acide lactique (Kihal *et al.*, 2006).

-La variabilité dans la production d'acide lactique chez les différentes espèces de notre collection était moins importante puisque il s'agit des souches qui appartiennent au même genre mais ça nous a pas empêché de les répartir selon leur pouvoir acidifiant en trois groupes distincts :

- Souche faiblement acidifiantes : SH4, SH8 et SH13. (**Fig12**)
- Souche moyennement acidifiantes : SH16, SH18 et SH3. (**Fig13**)
- Souche fortement acidifiantes : SH20, SH15 et SH1. (**Fig14**)

Tableau 6 : Illustre la cinétique d'acidité (°D) chez les neuves souches en fonction du temps (h)

	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	24h	48h
SH20	0	1	4	8	12	16	21	23	27	32	40	44
SH15	0	0	4	9	13	17	22	26	29	33	38	42
SH1	0	2	6	9	13	17	21	25	29	34	39	43
SH4	0	0	1	2	5	8	11	13	15	18	27	29
SH8	0	0	0	1	3	11	14	18	23	27	30	31
SH13	0	0	0	2	3	7	12	16	21	26	29	30
SH16	0	0	0	3	5	8	19	22	28	30	34	35
SH18	0	0	0	1	4	11	15	18	24	30	33	36
SH3	0	1	3	8	13	16	20	24	27	31	35	39

Tableau 7 : Illustre la variation du pH chez les neuves souches en fonction du temps(h).

	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	18h	24h	48h
SH20	6,55	6,41	6,3	6,22	6,15	6,03	5,75	5,63	5,55	5,37	5,22	4,98
SH15	6,55	6,54	6,33	6,21	6,05	5,86	5,75	5,68	5,43	5,31	5,19	5,04
SH1	6,54	6,34	6,18	6,01	5,91	5,61	5,39	5,28	5,21	5,05	4,98	4,97
SH4	6,57	6,55	6,54	6,46	6,33	6,28	6,12	5,97	5,88	5,71	5,54	5,3
SH8	6,61	6,6	6,59	6,56	6,41	6,25	6,11	5,96	5,72	5,6	5,41	5,2
SH13	6,57	6,42	6,41	6,39	6,29	6,22	5,84	5,65	5,51	5,4	5,31	5,28
SH16	6,54	6,53	6,5	6,38	6,21	6,3	6,15	5,84	5,62	5,47	5,22	5,11
SH18	6,52	6,45	6,4	6,35	6,3	6,15	6,08	5,85	5,63	5,46	5,31	5,09
SH3	6,55	6,4	6,35	6,14	6,04	5,81	5,51	5,32	5,24	5,2	5,11	5,04

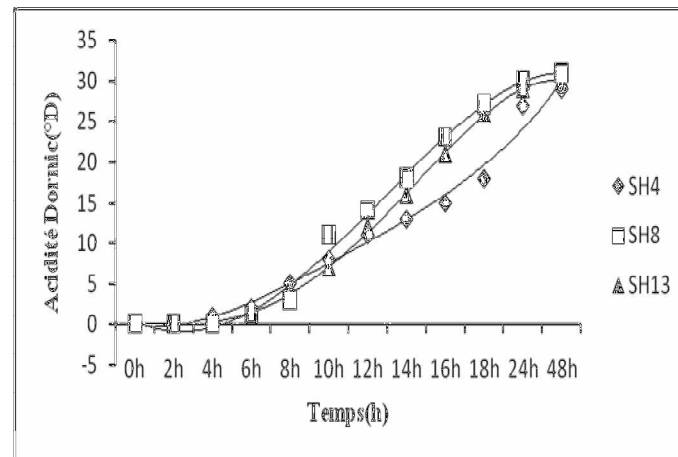
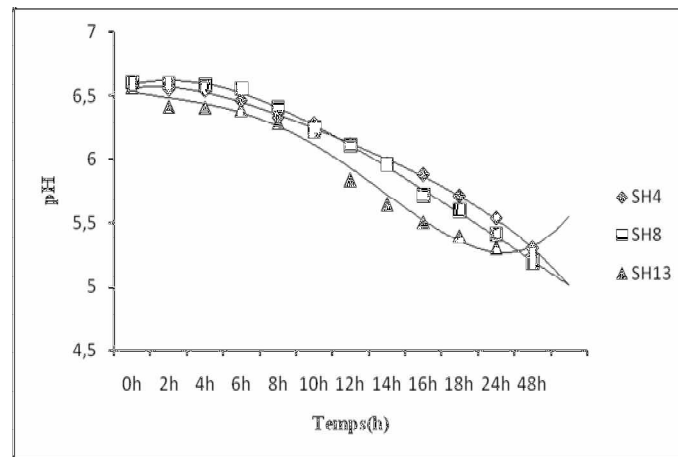


Figure 12 : Représente la cinétique d'évolution du pH (En haut) et de l'acidité Dornic (En bas) chez les souches pures (SH4, SH8 et SH13) en milieu lait

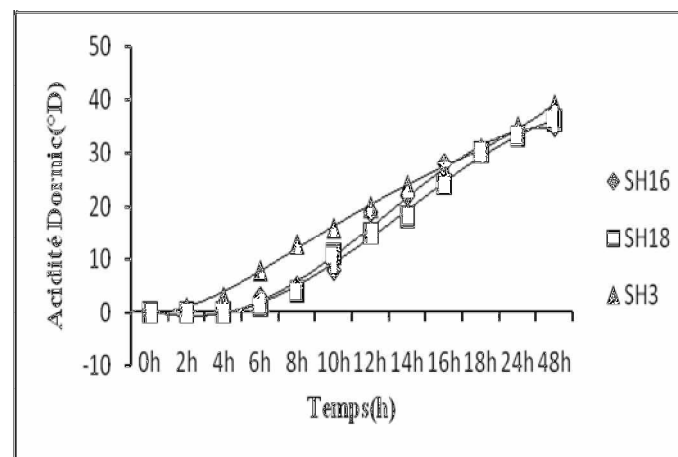
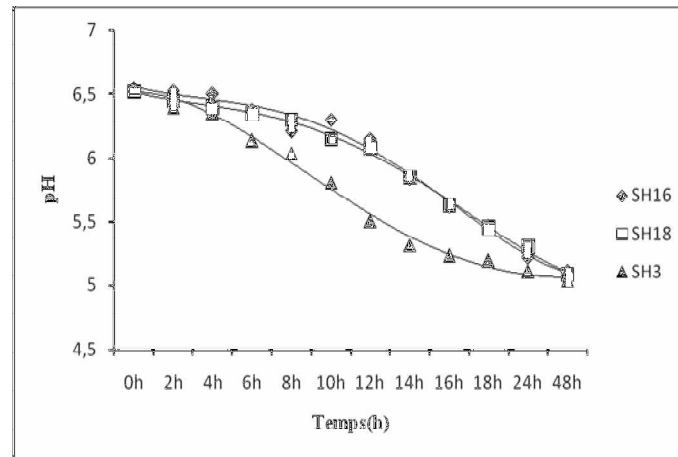


Figure13 : Représente la cinétique d'évolution du pH (En haut) et de l'acidité Dornic (En bas) chez les souches pures (SH16, SH18 et SH3) en milieu lait

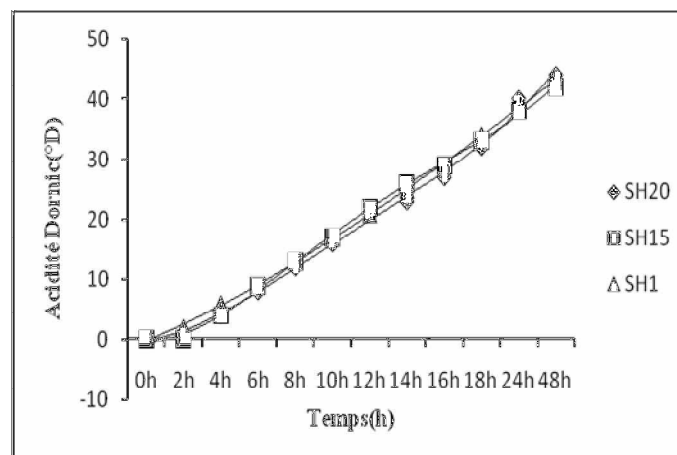
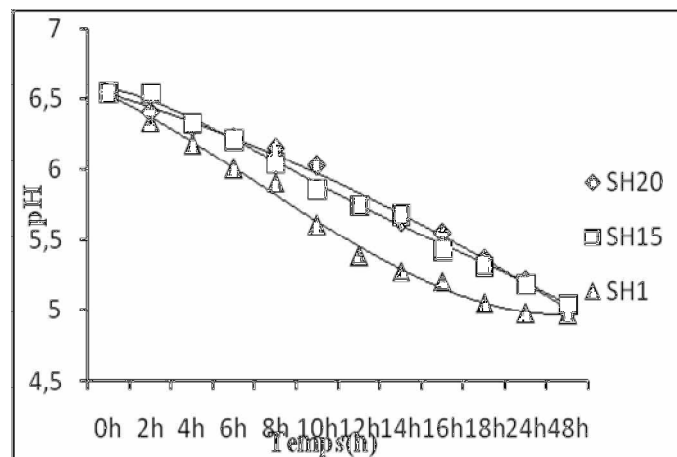


Figure14 : Représente la cinétique d'évolution du pH et de l'acidité Dornic chez les souches pures (SH20, SH15 et SH1) en milieu lait

On peut expliquer la variation dans la cinétique d'acidification par plusieurs facteurs, le facteur le plus important est l'aptitude des souches à posséder une activité protéolytique qui est codé par un matériel extra-chromosomique (Juillard *et al.*, 1998).

Nos observations ont porté également sur le temps de coagulation, toutes nos souches ont coagulé le lait après 24h d'incubation.

Le suivi du pH montre une diminution progressive pour toutes les souches isolées. La souche s'avère la plus performante c'est la SH20 avec un pH de 4,98 et une quantité de 4,4 mg d'acide lactique par 10ml de milieu de culture après 48h d'incubation.

La stabilité de la production de l'acide lactique par quelque souche de *Leuconostoc* à partir de la 48^{ème} heure explique la diminution de leurs populations après 48 heures et donc le déclenchement de la phase de latence. Cette disparition résulte du pH d'acidification du milieu incompatible avec le pH optimum de croissance des *Leuconostoc* situé entre 5,0-6,3 (Carr *et al.*, 2002). La sensibilité des leuconostocs serait liée à leur incapacité à maintenir un gradient de pH entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule bactérienne en présence de fortes concentrations d'acétate et de lactate (Carr *et al.*, 2002).



Figure15 : Coagulation du lait par les leuconostocs après 24h d'incubation à 30°C, la formation des ouvertures dans le coagulum.

4.2. Effet inhibiteur des *Leuconostoc* sur les germes pathogènes:

4.2.1. Les interactions et la recherche de la nature de l'agent inhibiteur :

Après l'étude du pouvoir acidifiant des isolats, nous nous sommes intéressés à d'autres propriétés technologiques de nos souches, qui a consisté à tester leur action sur la croissance de deux bactéries pathogènes « *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus cereus* ATCC 11778 » avec trois répétitions.

Au cours de la chaîne de fabrication et de la conservation, les produits fermentés sont jamais à l'abri des contaminations par les bactéries indésirables pathogènes et de détérioration (Castano *et al.*, 2005), *Clostridium Sp.*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* sont parmi les germes pathogènes majeurs impliqués dans les toxico-infections alimentaires (Benhamouche., 2005; Guessas., 2007). Comme d'autres bactéries lactiques les *Leuconostocs* produisent une variété de composés antimicrobiens, tels que les acides organiques, peroxyde d'hydrogène, les phages lysogènes, le diacétyle et les bactériocines (Castano *et al.*, 2005).

Les tests d'interactions entre les bactéries pathogènes confrontés avec les neuf souches de *Leuconostoc* isolées dans la première partie de notre travail nous ont permis de conclure que le diamètre d'inhibition varie selon les espèces.

Les résultats obtenus par la mesure des zones d'inhibition après plusieurs essais ont montré que le diamètre des zones d'inhibition varie de 0 à 7 mm. Il était plus grand vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, par contre aucune inhibition n'a été détectée sur *Bacillus cereus* ATCC 11778.

Les tableaux 8 et 9 illustrent les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes par les neuf isolats de *Leuconostoc* correspondant à la moyenne de trois répétitions.

Pour rechercher si la cause des inhibitions est due à une substance de nature protéique ou au moins dont la partie porteuse de cette activité est protéique on a éliminé deux causes d'inhibitions : L'acidification du milieu et la lysogénie.

-L'acidification du milieu :

Les leuconostocs produisent des acides organiques ; notamment de l'acide lactique et acétique (Kihal *et al.*,2006) qui se libèrent dans le milieu de culture ce qui conduit à l'acidification et qui peuvent être une cause principale d'inhibition des souches pathogène. L'utilisation d'un tampon phosphate nous a permis de stabiliser le pH et donc d'exclure l'effet de l'acidité qui présente un pouvoir antimicrobien. Des travaux similaires ont été réalisés par Labioui *et al.*, (2005) lorsqu'ils ont neutralisé le surnageant pour éliminer le facteur acidifiant lors des études faites sur la sélection de bactéries lactiques antimicrobiennes.

Les souches inhibitrices observées en milieu non tamponné étaient plus importantes que celles observées en milieu tamponné. Le tableau 9 montre clairement la réduction du diamètre des zones d'inhibition en milieu tamponné chez quelques souches et la disparition des zones dans d'autres souches, ainsi trois souches seulement (SH1, SH8 et SH20) ont produit des inhibitions considérables sur milieu tamponné. Tandis que, la zone d'inhibition de la croissance du germe cible « *Staphylococcus aureus* » a été presque nulle chez les souches (SH13, SH15, SH16 et SH4), en revanche, aucune zone d'inhibition n'a été détectée par les souches de : *Ln lactis* (SH3) et *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* (SH18) en milieu tamponné. Ceci suggère que l'activité antimicrobienne chez l'ensemble de ces souches était probablement due à l'acidité, ainsi selon Ammor *et al.*, (2005) une bonne acidification lactique provoque l'inhibition des germes pathogènes et plus particulièrement les espèces de *Staphylococcus aureus*.

-Les attaques des phages lysogènes :

Le test des phages s'est révélé négatif pour l'ensemble des souches, par conséquent aucune des inhibitions observées dans notre travail n'était due à une lysogénie.

-La sensibilité du filtrat antagoniste à l'action des enzymes et sa résistance à la température:

Les bactériocines sont des substances qui existent dans la partie extracellulaire de la bactérie (Hugas *et al.*,2003). L'absence de la zone d'inhibition dans le puits 1 contenant le culot bactérien qui correspond à la fraction cellulaire et sa présence dans les puits contenant le surnageant bactérien représentant la fraction extracellulaire indique que le culot bactérien ne présente aucun effet sur la croissance de la souche test et donc confirme que la substance inhibitrice est localisée dans le milieu de culture de la bactérie productrice, explique que l'activité antimicrobienne est due à une substance extracellulaire qui se libère

dans le surnageant . Ces résultats sont comparables a ceux trouvé par Labioui *et al.*,(2005) lors de leurs études sur la sélection des souches lactiques productrices de substances antibactériennes et qui ont constaté que l'activité bactéricide de la souche lactique BL_{h5} du genre *Streptococcus* se trouve uniquement dans le milieu de culture ; suggère la formation de substance extracellulaire.

Les bactériocine des *Leuconostoc* font partie de la classe II étant connues pour être des peptides non antibiotiques résistant à des températures élevées (Lachance 2000, Labioui *et al.*,2005), les figures 17 et 18 et le tableau 10 illustrent les résultats obtenues après traitement du filtrat antagoniste issu des souches inhibitrices par des enzymes protéolytiques (α -chymotrypsine et la trypsine) et par la chaleur et confirme la localisation de la substance inhibitrice :

-La figure 17 montre la disparition totale de la zone d'inhibition de la croissance de la souche test *Staphylococcus aureus* en présence de la trypsine ceci indique que l'agent inhibiteur contenant dans le filtrat issu de la souche inhibitrice SH20 est sensible à la protéase utilisée. Le traitement thermique à 100°C a démontré que la substance inhibitrice à un caractère thermostable, le surnageant reste active et l'activité antimicrobienne persiste et le diamètre de la zone d'inhibition avoisine le témoin ; Ces résultats se concordent avec ceux qui ont été observés par Benhammouche., (2005), Labioui *et al.*,(2005) et Guessas.,(2007) qui ont travaillé sur différent genre de bactéries lactiques y compris *Leuconostoc* et sont aussi arrivés à confirmer que l'activité antibactérienne chez les genres appartenant au groupe de bactéries lactique est peut être due à une substance extracellulaire de nature protéique et thermolabile.

-Le tableau 10 récapitule les résultats qui ont été trouvé dans la recherche de la nature de la substance inhibitrice chez tous les isolats. La figure18 montre aussi la persistance de la zone d'inhibition de la croissance du *Staphylococcus aureus* par la souche *Ln mesenteroides* subsp *cremoris* SH18 dans le puits 3 contenant l'enzyme protéolytique et sa disparition dans le puits 5 indique que la SH18 a été résistantes à la trypsine donc elle est loin d'être de nature protéique. Ce résultat ainsi que le résultat obtenue dans la recherche de l'acidité en milieu tamponnée présumant et confirment que l'inhibition visualisé par cette souche été due à l'acidité.

Les résultats obtenus après le traitement thermique du surnageant contenant la substance inhibitrice et les tests des enzymes protéolytiques ainsi que les tests supplémentaires à savoir ; l'élimination de l'acidité et l'attaque des phages, nous ont permis de sélectionner probablement les souches productrices de bactériocines qui est une substance de nature protéique et thermostable (Hugas *et al.*, 2003), on a pu remarquer que parmi les cas d'inhibition mentionnées dans le tableau 9, deux souches seulement SH1 et SH20 permettent de suggérer que l'activité antagoniste vis à vis *Staphylococcus aureus* soit due à une substance de nature protéique. L'inhibition qui a été rencontrée chez la souche de *Ln mesenteroides* subsp *dextranicum* (SH8) est loin d'être due à la production de bactériocine ou à l'acidité d'après la persistance des inhibitions en éliminant ces deux facteurs.

On remarque que seules les souches qui ont été considérées comme performantes pour leur pouvoir acidifiant SH20 et SH1 dans l'étude de la cinétique d'acidification, ont donné les plus grandes zones d'inhibition et donc ont été considérées comme souches performantes pour leur pouvoir inhibiteur. Labioui *et al.*, (2005) ont constaté la même observation lors de leurs études sur le pouvoir bactéricide de bactéries qui appartiennent au différent genre lactique « *Streptococcus* , *Enterococcus* et *Lactobacillus* » visé contre la même bactérie pathogène *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

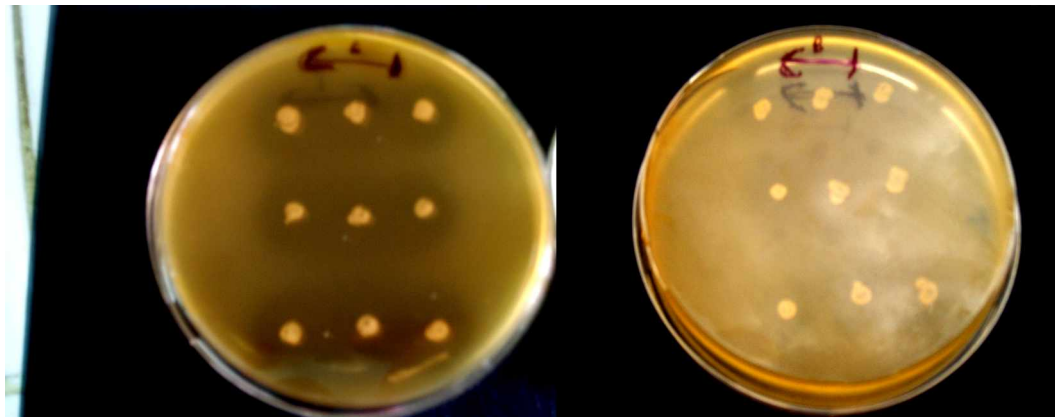
Les résultats concordent des travaux antérieurs réalisés par Hamama *et al* (2002), Ananou *et al.*, (2005), Guessas., (2007), González *et al.*, (2007) montrant que les bactéries lactiques y compris *Leuconostoc* possèdent une activité antimicrobienne dirigée essentiellement contre des espèces taxonomiquement proche de ces bactéries productrices de bactériocine .

Tableau 8: Résultats des interactions entre souches productrices « *Leuconostoc* » et les souches tests « *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* » (la zone d'inhibition est mesurée en mm), les résultats présentent correspondant a la moyenne des trois essais.

Souche lactique	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
SH1	4	0
SH4	2	0
SH3	2	0
SH8	5	0
SH13	2	0
SH15	4	0
SH16	2	0
SH18	3	0
SH20	7	0

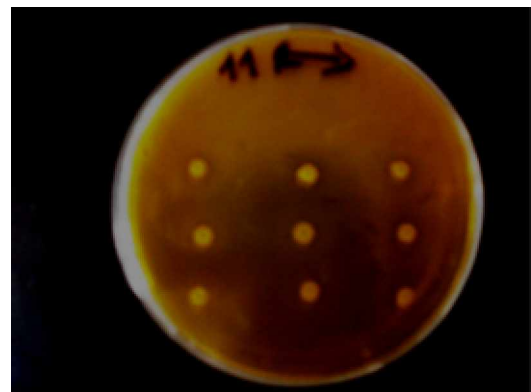
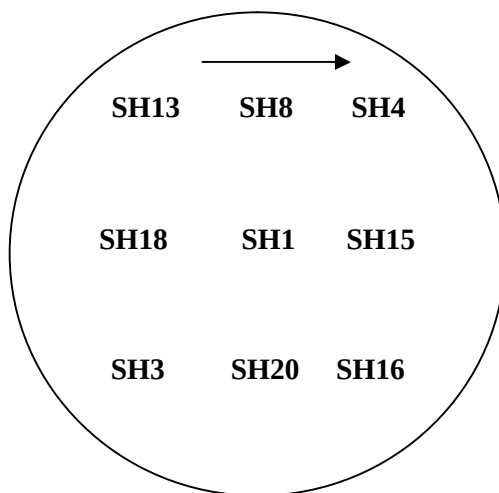
Tableau 9: Résultats des interactions entre souches productrice « *leuconostoc* » et les souches tests « *Staphylococcus aureus* » sur milieu tamponné et non tamponné (la zone d'inhibition est mesurer en mm), les résultats présentent correspondant a la moyenne des trois essais.

Souche lactique	Milieu non tomponné	Milieu tomponné
SH1	4	3
SH4	2	1
SH3	2	0
SH8	5	3
SH13	2	1
SH15	3	1
SH16	2	1
SH18	1	0
SH20	7	6



-A

-B



-C

Figure16 : .L'activité antimicrobienne des isolats de *Leuconostoc* diriger contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus cereus* ATCC 11778

(A) : Contre *St.aureus* sur milieu tamponné.

(B) : Contre *Bacillus cereus* sur milieu tamponné.

(C) : Contre *St.aureus* sur milieu non tamponné.

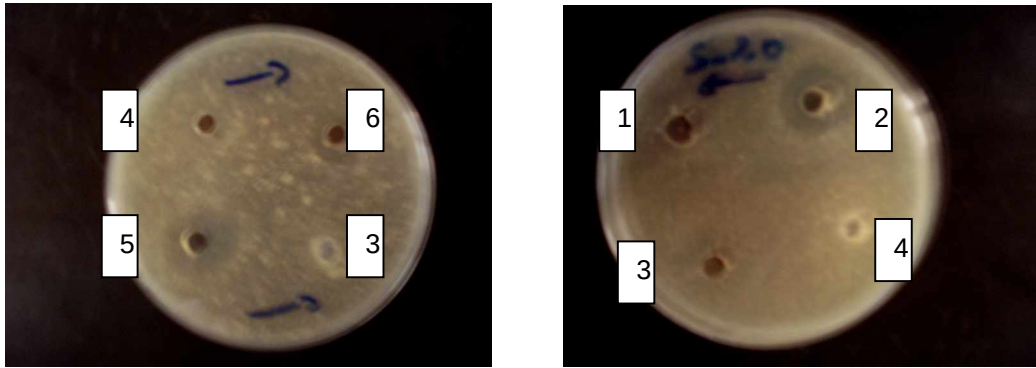


Figure17 : l'action des enzymes protéolytique sur l'activité antimicrobienne de la souche SH20 et sa résistance à la température

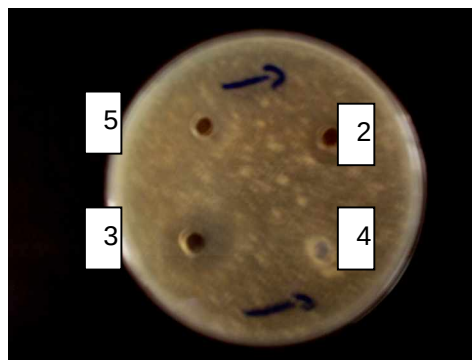


Figure18 : l'action des enzymes protéolytique sur l'activité antimicrobienne de la souche SH18

- 1- Le culot bactérien
- 2-Surnageant bactérien non traité
- 3- Surnageant bactérien +trypsine
- 4- Surnageant bactérien + α -chymotrypsine
- 5-Surnageant bactérien pH7
- 6-Surnageant bactérien chauffé (100°C/30min)

Tableau 10: Résultats de la nature de l'agent inhibiteur des interactions entre souches productrice « *Leuconostoc* » et la souche test « *Staphylococcus aureus* »

	1	2	3	4	5	6
SH1	-	+	-	+	+	+
SH3	-	+	+	+	-	
SH4	-	+	+	+	-	
SH8	-	+	+	+	+	-
SH13	-	+	+	+	-	
SH15	-	+	+	+	-	
SH16	-	+	+	+	-	
SH18	-	+	+	+	-	
SH20	-	+	-	+	+	+

1- Le culot bactérien

2- Surnageant bactérien non traité

3- Surnageant bactérien +trypsine

4- Surnageant bactérien + α -chymotrypsine

5- Surnageant bactérien pH7

6- Surnageant bactérien chauffé (100°C/30min)

(-)- Absence d'inhibition

(+)- Présence d'inhibition

4.2.2. Etude de l'évolution du pH, l'acide lactique et la cinétique de croissance en culture pure et mixte de la souche test *Staphylococcus aureus* et la souche productrice SH20 :

4.2.2.1. L'évolution du pH et de l'acide lactique :

En se basant sur les résultats obtenus dans l'étude de l'interaction entre la souche inhibitrice et la souche test on a remarqué que la souche SH20 « *Ln mesenteroides* subsp. *mesenteroides* » a donné la meilleur zone d'inhibition « 7mm de diamètre » avec la souche test « *Staphylococcus aureus* » et donc a été considéré comme la souche la plus performante de notre collection.

L'étude de l'évolution du pH de la souche inhibitrice la plus performante « SH20 » et la souche test « *Staphylococcus aureus* » en culture mixte et en culture pure a montré une différence significative entre ces deux milieux ; en culture pure le pH a pu atteindre 5,25 pour la souche lactique *Ln mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et 5,40 pour la souche pathogène *Staphylococcus aureus* (Tableau 12). En revanche pour la culture mixte le pH était égale à 6,06 après 24h d'incubation ce qui explique la présence d'un antagonisme entre souche productrice et souche test, même résultats ont été remarqué par Benhamouche (2005) le pH été de 4,53 pour la souche lactique productrice, 5,2 pour *Staphylococcus aureus* et 6 en culture mixte après 24h d'incubation, reste à confirmé la souche inhibitrice par la production de l'acide lactique et l'évolution de la croissance de ces deux souches en culture pure et mixte.

Les résultats obtenus dans l'étude de l'évolution de la production de l'acide lactique (Tableau 11), montre clairement que la quantité d'acide lactique produite se diffère entre les deux biotopes, on a noté 3,5 g pour *Staphylococcus aureus* et 3,9 g pour la souche productrice *Ln mesenteroides* subsp. *mesenteroides* après 24h d'incubation en culture pure, en revanche la production d'acide lactique été moins importante en culture mixte (20g), on explique cette défaillance par l'existence d'un antagonisme entre les deux souches, Hamama *et al.*, (2002) ont conclu la même remarque pendant les travaux réalisé sur l'étude de l'inhibition de *Staphylococcus aureus* par la nisine produite par des souches de *Lactococcus lactis* durant la fabrication du jben (fromage traditionnel)

4.2.2.2. Dénombrement de *Staphylococcus aureus* en culture pure et en culture mixte :

L'étude de la croissance de la souche pathogène *Staphylococcus aureus* a été réalisée en culture pure et en culture mixte (Tableau 13). Le nombre des colonies est exprimé en ufc /ml. On note qu'il n'y a pas une différence importante pour la souche productrice SH20 que se soit en culture pure ou mixte, le nombre d'unité logarithmique était presque identique 9,98 log ufc /g et 10,12 log ufc /g respectivement, le résultat était différent pour la souche test une diminution du nombre logarithmique a été bien remarqué de 9,11 log ufc /g en culture pure à 7,55 log ufc /g en culture mixte après 24h d'incubation. Ces résultats peuvent être comparés aux études similaires réalisées par Rodrigues *et al.* (2005) sur la croissance et l'inhibition de *Staphylococcus aureus* en culture mixte avec d'autre genre de bactéries lactique « *Lactococcus lactis* » en fromagerie qui ont montré que le nombre de *Staphylococcus aureus* a été de 0,40 log ufc /g après 24h d'incubation comparé au témoin qui était de 5,16 log ufc /g. Mise à part les *Leuconostoc* et les *Lactococcus*, il existe d'autres bactéries appartiennent aussi au groupe lactiques qui sont capable d'inhiber le *Staphylococcus aureus* et d'autres germe pathogènes qui ont fait l'objet des axes de recherche, Héquet *et al.*, (2007) ont caractérisé de nouvelles bactériocines de bactéries lactique qui stimule l'inhibition de *Listeria monocytogenes* ; *Leuconostoc pseudomesenteroides* 2733 a produit une nouvel bactériocine qui a été purifié et partiellement caractérisé, la croissance de *Listeria monocytogenes* a été ainsi inhibé par *Lactobacillus sakei* 2521.

Tableau 11: L'acidité Dornic (°D) en culture pure et mixte en fonction du temps (h) de la souche inhibitrice SH20 et le *Staphylococcus aureus*

Temps	SH20	<i>St. aureus</i>	Culture mixte
0h	0	0	0
3h	3	2	3
6h	7	6	8
9h	13	13	12
12h	17	15	14
15h	20	23	16
18h	30	29	18
24h	39	35	20
48h	45	40	25
72h	46	40	22
96h	46	37	20

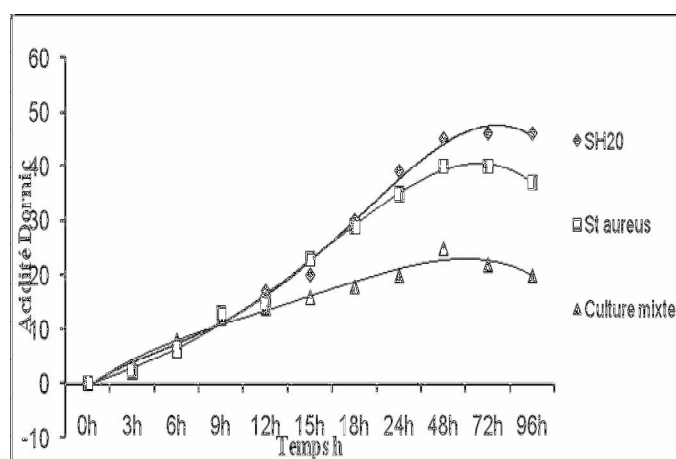


Figure19 : Evolution de l'acidité Dornic en culture pure et mixte en fonction du temps de la souche inhibitrice SH20 et le *Staphylococcus aureus*

Tableau 12: Evolution du pH d'une culture pure et mixte de la souche inhibitrice SH20 et le *Staphylococcus aureus* en fonction du temps

Temps	SH20	St aureus	Culture mixte
0h	6,58	6,60	6,61
3h	6,42	6,55	6,58
6h	6,30	6,41	6,41
9h	6,25	6,32	6,32
12h	5,96	6,10	6,24
15h	5,75	5,80	6,15
18h	5,63	5,68	6,11
24h	5,25	5,40	6,06
48h	4,99	4,98	5,79
72h	4,98	4,95	5,71
96h	4,91	4,94	5,59

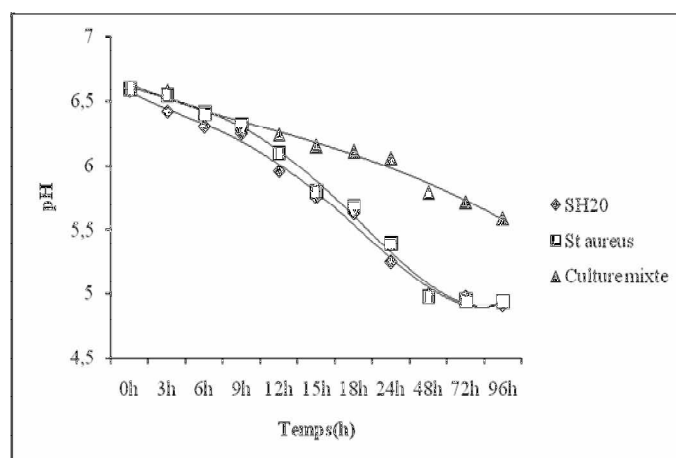


Figure20 : Evolution du pH d'une culture pure et mixte (SH20, *St. aureus*).

Tableau 13: Evolution de la croissance de la souche inhibitrice SH20 et le *Staphylococcus aureus* en une culture pure et mixte en fonction du temps

Temps(h)	SH20	SH20 mixte	<i>St. aureus</i>	<i>St. mixte</i>
0h	5,92	5,93	5,83	5,52
3h	6,15	6,11	5,98	5,64
6h	6,20	6,28	6,10	5,68
9h	6,45	6,47	6,85	5,90
12h	6,51	6,77	6,93	5,94
15h	7,03	7,10	7,35	6,09
18h	7,58	7,67	7,51	6,39
24h	9,98	10,12	9,11	7,55
48h	10,28	10,27	8,53	7,48
72h	10,26	9,12	8,08	6,47
96h	9,30	8,08	7,55	5,87

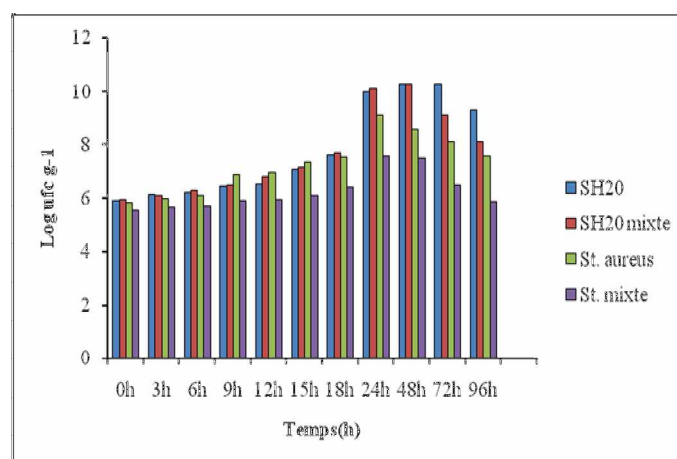


Figure 21 : Evolution de la croissance de la souche inhibitrice SH20 et le *Staphylococcus aureus* en une culture pure et mixte en fonction du temps



Figure 22 : Croissance de *Staphylococcus aureus* en culture pure et mixte sur milieu Shapman après 96h d'incubation à 37°C.

Conclusion

Les espèces de *Leuconostoc* sont des bactéries lactiques exigeantes sur le plan nutritionnel, qui se caractérisent par la production du CO₂ et l'incapacité d'hydrolyser l'arginine. Leur utilisation est apparue empiriquement dans la fabrication des aliments fermentés divers comme les fromages, les charcuteries, les boissons fermentées, l'ensilage, les saumures etc. Leur aptitude de produire les exopolysaccharides « Le dextrane » et le diacétyle leur donne un rôle important dans la modification de la saveur et la texture des aliments.

Les principaux objectifs de ce travail ont été réalisés avec succès, des informations de base sur les caractéristiques ont été conclues. Toutefois, beaucoup de travail reste à réaliser avant de comprendre et de maîtriser totalement ces bactéries.

Nous avons entamé notre travail par l'isolement et la constitution d'un souche de *Leuconostoc* isolé du lait cru de chèvre et d'un produit fermenté « fromage Roquefort »

L'utilisation des milieux sélectifs MSE et MRS à 30 µg/ml de vancomycine nous a permis d'éliminer les autres bactéries lactiques qui peuvent se confondre avec les *Leuconostocs*.

On note que neuf souches de *Leuconostoc* ont été isolées dont 30% du lait de chèvre et 70% du fromage Roquefort.

Par la suite les isolats ont fait l'objet des tests d'inhibition vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et de *Bacillus cereus*. Seulement *Staphylococcus aureus* a été inhibé par contre aucune inhibition n'a été détectée sur *Bacillus cereus* ATCC 11778.

Il apparaît alors dans les résultats que plusieurs cas d'activité antagonistes ont été décelés, ainsi la recherche de la nature de l'agent inhibiteur, ce composé antimicrobien qui constituerait une arme efficace contre les germes d'altération ou les pathogènes, nous a permis de constater que l'inhibition peut être due à :

- La production d'acide lactique ce qui est le cas des souches (SH4, SH3, SH13, SH15, SH16 et SH18)
- La synthèse d'un agent inhibiteur de nature protéique (bactériocine) cas des souches SH1 et SH20

On a remarqué aussi que la bactériocine produite par la souche SH20 a donné des inhibitions importantes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Les résultats apportés par notre travail nous ont permis de mettre en valeur plusieurs aspects technologiques des leuconostocs et d'observer que même au sein du même genre et de la même espèce il existe de grande variation autant au niveau de l'aptitude acidifiante que l'activité antimicrobienne. La détermination de ces deux fonctions est cependant un bon outil pour la prédiction de la capacité des souches testés à donner un bon produit fermenté ayant les qualités désirer.

Les tests utilisés pour évaluer les différentes activités sont simples et rapides pour le développement d'un modèle prédictif et également un bon outil pour la sélection et le développement de nouveau ferment ayant de très bonnes aptitudes fermentaire. Une meilleure caractérisation des activités enzymatiques des souches bactériennes est donc une approche simple qui peut être très utile à l'industrie, car la qualité des produits fermentés reflète la bonne connaissance des activités métaboliques des levains utilisés.

Enfin, en extension à ces perspectives, notre ambition porte maintenant sur un autre volet de recherche plus vaste ; nous suggérons l'utilisation des techniques moléculaires afin de confirmer l'identification de nos souches, l'extraction de l'ADN plasmidique et le clonage des gènes responsables des propriétés technologiques. Nous espérons ainsi donner suite à l'étude de la substance inhibitrice de l'isoler, là purifiée et l'identifiée avec précision pour permettre sont exploitation dans la bio-préservation d'aliment ou d'ensilage et dans la biothérapie.

References bibliographiques

A

- Aarnikunnas, J., Ronnholm, K et Palva, A. (2002). The mannitol dehydrogenase gene (mdh) from *Leuconostoc mesenteroides* is distinct from other known bacterial mdh genes *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 665-671.
- Achemchem. F et Abrini .J., (2004). Production de bactériocines par des bactéries lactiques isolées à partir du jben de chèvre du nord du Maroc. Nouvel tendance dans l'ingénierie biomédical, **34** :170-179.
- Ackermann, H. W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch. Virol*, 146: 843-857.
- Agarwal, K. N., et Bhasin, S. K. (2002). Feasibility studies to control acute diarrhoea in children by feeding fermented milk preparations Actimel and Dahi. *Euro. J. Nutrition*, 56:S56-S59.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E et Chevallier, I. (2005). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility -Screening and characterization of the antibacterial compounds- Food control. Elsevier **1**: 2-6.
- Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A et Valdivia, E. (2005). Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Science*; 71: 549-556.
- Antunes, A., Rainey, F.A., Nobre, M.F., Schumann, P., Ferreira, A.M., Ramos, A., Santos, H et de Costa M.S. (2002). *Leuconostoc ficulneum* sp.nov., a novel lactic acid bacterium isolated from a ripefig, and reclassification of *Lactobacillus fructosus* as *Leuconostoc fructosum* comb. nov. *Inter. J. System. Evolutionary Microbiol.* 52 :647 -655.

B

- Bandell M., et Lolkema J. S. (2000). Arg-425 of the citrate transporter CitP is responsible for high affinity binding of di-and tricarboxylates. *J. Biol. Chem.*, **275**:39130-39136.
- Barrangou, R., Sung-Sik, Y., Breidt Jr., F., Fleming, H. P., et Klaenhammer, T. R. (2002). Identification and characterization of *Leuconostoc fallax* strains isolated from an industrial Sauerkraut fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2877-2884.
- Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M. Ouzrout, R, (2005): Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "Arabia et Kabile". *In0 scien.Tech.* 23 :30-37.
- Barrette, J., Champagne, C. P., Roy, D., et Rodrigue, N. (2000). The production of mixed cultures containing strains of *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc cremoris* and *Lactobacillus rhamnosus*, on commercial starter media. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* , 25:288-297.
- Bekal S., Diviès C., Prévost H. (1998): Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Lait* 78 :3-10.
- Bellengier, P., Hemme, D et Foucaud, C. (1994). Citrate metabolism in sixteen *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and subsp. *dextranicum* strains. *J. Appl. Bacteriol.* 77 :54-60.
- Bellengier, P., Richard, J et Foucaud, C. (1997). Associative growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* strains in milk. *J. Dairy Sci.* **80** : 1520 –1527.
- Benhamouche, N. (2005). Sélection de bactéries lactiques productrices de substances antimicrobiennes de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée (LMA). Thèse de magister. Université d'Oran Es-Senia
- Bertelsen, H., Andersen, H et Tvede, M. (2001). Fermentation of d-tagatose by human intestinal bacteria and lactic acid bacteria. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **13**: 87-95.
- Bibal, B., Vayssier, Y., Tournou, M et Pareilleux, A. (1989). Enhanced inhibitory effect of lactic acid on growth kinetics of *Streptococcus cremoris* during nutritional medium limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30:630-635.
- Biet, F., Cenatiempo, Y., et Frémaux, C. (2002). Identification of a replicon from pTXL1, a small cryptic plasmid from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Y110, and development of a food-grade vector. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6451-6456.

- Bjorkroth, K. J., Geisen, R., Schillinger, U., Weiss, N., de Vos, P., Holzapfel, W. H., Korkeala, H. J., et Vandamme, P. (2000). Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3764-3772.
- Bjorkroth, J et Holzapfel, W, (2003). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: M. Dworkin, et al. (Eds.), The prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community 3. Berlin: Springer.
- Bjorkroth, J et Holzapfel, W, (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. chap 1.2.9. In Prokaryotes. 4:267-319
- Blom, H., Katla, T., Holck, A., Sletten, K., Axelsson, L et Holo, H. (1999). Characterization, production, and purification of leucocin H, a two-peptide bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. *Current Microbiol.* **39** : 43 -48.
- Bourgeois, C.M., Mexle J.F et Zucca (1996). Microbiologie alimentaire aspect microbiologique tome 1.
- Bourel, G., Henini, S., Krantar, K., Oraby, M., Divies, C et Garmyn, D. (2001). Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. *Le lait* , **81** : 75-82.
- Bozonnet, S., Dols-Laffargue, M., Fabre, E., Pizzut, S., Remaud-Simeon, M., Monsan, P. et Willemot, R. M. (2002). Molecular characterization of DSR-E, an alpha-1,2 linkage-synthesizing dextransucrase with two catalytic domains. *J. Bacteriol.* **184**:5753-5761.
- Brashears, M. M., Jaroni, D., et Trimble, J. (2003). Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *E. coli* O157:H7 in cattle. *J. Food Protection*, **66**: 355-363.
- Buckenhushkes, H. J. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 253-272.

C

- Cabo, M. L., Braber, A. F et Koenraad, P. M. (2002). Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *J. Food Protection*, **65**:1309-1316.
- Caplice, E et Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **50**: 131-149.
- Carr, F. J., Chill, D., et Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Rev. Microbiol.* **28**:281-370.
- Castano, S., Desbata, B., Delfour, A., Dumas, J.M., Silva, A et Dufourcq, J., (2005): Study of structure and orientation of mesentericin Y105, a bacteriocin from Gram-positive *Leuconostoc mesenteroides*, and its Trp-substituted analogues in phospholipid environments. *Bioch. Bioph. Acta* **1668** : 87- 98
- Champagne, C. P., et Gardner, N. J. (2002). Effect of process parameters on the production of *Leuconostoc mesenteroides* cultures. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* **28**:291-296.
- Cibik, R., et Chapot-Chartier, M.-P. (2000). Autolysis of dairy leuconostocs and detection of peptidoglycan hydrolases by renaturing SDS-PAGE. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 862-869.
- Cibik, R., Lepage, E., et 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. *System. App. Microbiol.* **23**: 267-278.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F et Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**: 1-20.
- Coffey, A., Harrington, A., Kearney, K., Daly, C et Fitzgerald, G. (1994). Nucleotide sequence and structural organization of the small, broad-host-range plasmid pCI411 from *Leuconostoc lactis* 533. *Microbiol.* **140**: 2263-2269.

- Cogan, T. M. (1995). Flavour production by dairy starter cultures. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement*, 79:49S-64S.
- Cogan, T. M. (2002). Improving Cheddar cheese flavour by microbiological way. *Int Dairy Congress*, Paris, France, 26 September: 24-27.
- Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M. C et Rodriguez, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64:409-421.
- Cogan, T. M et Jordan, K. N. (1994). Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *J.Dairy Sci.* 77, :2704-2717.
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 269-280.
- Cooke, D., Foster, T. J., Galema, S. A., Ledebor, A. M et Sanders, J. W. (2002). Method of preparing a fermented milk-based food product. Unilever, European Patent, 1 :180 -329
- Corbier, C., Krier, F., Mulliert, G., Vitoux, B et Revol-Junelles, A. M. (2001). Biological activities and structural properties of the atypical bacteriocins mesenterocin 52B and leucocin B-TA33a. *Appl. Environ.Microbiol.* 67:1418-1422.

D

- dal Bello, F., Walter, J., Hammes, W. P et Hertel, C. (2003). Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition. *Microbial Ecology*, 45 :455-463.
- Day, D. F. (1992). Spoilage in the sugar industry. In B. J. B. Wood (Ed.), *The lactic acid bacteria. Elsevier Appl. Sci.* pp. 343-362.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E et Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76** : 159-184.
- Dellaglio F., Delassart I., Tavvani S., Curk M. C et Janssens. D. (1995). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *J. Bactéries lactiques aspects fondamentales et technologiques*. **1** : 25-114.
- De Man, J.C., M. Rogosa, E.M. Sharpe, :(1960). A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.
- Demirci, Y et Hemme, D. (1995). Acidification test based on the use of biomass for screening of *Leuconostoc*. Application to Ln. mesenteroides strains isolated from French raw milk cheeses. *J. Dairy Res.* 62: 521-527.
- Derre, I., Rapoport, G et Msadek, T. (1999). CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 31:117-131.
- De Roissard, H.B et Luquet, (1994). F.M. Taxonomie, métabolisme, croissance et génétique des bactéries lactiques. Vol. Bactéries lactiques (Tome 1), Ed. l'Orica. France p: 25:204.
- Dessart, S. R et Steenson, L. R. (1995). Biotechnol. of dairy *Leuconostoc*. In Y. H. Hui, et G. G. Khachatourians (Eds.), *Food Biotechnol: Microorganisms* pp. 665-702.
- Devoyod, J.J et Poullain, F. (1988). Les leuconostocs. Propriété: Leur rôle en technologie laitière. *Le Lait*, 68 :249-280.
- De Vuyst, L., et Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23:153-177.
- Deye, G., Lewis, J., Patterson, J et Jorgensen, J. (2003). A case of *Leuconostoc* ventriculitis with resistance to carbapenem antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 37 :869-870.
- Dhodapkar, K. M et Henry, N. K. (1996). *Leuconostoc* bacteremia in an infant with short-gut syndrome: Case report and literature review. *Mayo Clinical Proceedings*, 71: 1171-1174.
- Dicks, L. M., Dellaglio, F et Collins, M. D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 45, 395-397.

Djouzi, Z., Andrieux, C., Pelenec, V., Somarriba, S., Popot, F., Paul, F., Monsan, P et Szytli, O. (1995). Degradation and fermentation of a-gluco-oligosaccharides by bacterial strains from human colon: In vitro and in vivo studies in gnotobiotic rats. *J. Appl. Bacteriol.* 79 :117-127.

Doleyres Y.(2003). Production en continue de ferments lactiques probiotique par la thechnologie des cellules immobilisées. Thèse présentée à la Faculté des etudes supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor(Ph.D). Mars 2003 Québec

Drosinos, E.H., Mataragas, M., Nasis, P., Galiotou, M et Metaxopoulos, J. (2005). Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131, *Int J. Microbiol* 99 :1314-1323.

Drosinos .E.H, Mataragas.M, Metaxopoulos,J.(2006). Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131 *Meat Science* 74 690-696

Droult S., Corthier G., (2001): Effet des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *INRA,EDP Sciences*, (2001) pp:102-104.

E

Eggleston, G et Legendre, B. (2003). Mannitol and oligosaccharides as new criteria for determining cold tolerance in sugarcane varieties. *Food chemistry*, 80: 451-461

Ennahar, S., Cai, Y et Fujita, Y. (2003). Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:444-451.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K et Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: Biosynthesis, structure, and activity. *FEMS Microbiol Rev*, 24 :85-106.

Ergan, F., Thomas, D et Chang, T. M. (1984). Selection and microencapsulation of an "NADH-oxidizing" bacterium and its use for NAD regeneration. *Appl. Bioch. Biotechnol.* 10:61-71.

F

Facklam, R. R., Pigott, N., Franklin, R et Elliott, J. (1995). Evaluation of three disk tests for identification of *enterococci*, *leuconostocs*, and *pediococci*. *J. Clinical Microbiol.* 33 885-887.

FAO. (1966). Toxicological evaluation of some antimicrobials, antioxydants, emulsifiers, stabilizers, flour-treatment agents, acids and bases. FAO Nutrition Meetings Report Series, 40: 339.

Fauchais, A. L., Roques, S., Druesne, L., Verdonck, A., Chassagne, P., Bercoff, E., Doucet, J et Frébourg, N. (2003). Rave opportunistic infection due to *Leuconostoc* species. *La Revue de Medecine Interne*, 24:268-275.

Feord, J. (2002). Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82:353-360.

Fédération International du Lait (1998). "Lait et produit laitiers, Préparation des échantillons et des dilutions en vue de l'examen microbiologique", Document 122C.

Fleming, H. P, Erchells, J.L et Casilow R.N (1975). Microbiol inhibition on isolate *Pediococcus* from cucumber bane. *Appl. Environ. Microbiol.* 30 :1040-1042.

Foucaud, C., Hemme, D., et Desmazeaud, M. (2001). Peptide utilization by *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl Microbiol*, 31: 20-25.

Freney, J., Renaud, F., Hansen, W et Bollet, C. (2000) : Edition ESKA Paris, pp : 785 : 783-790.

G

Garvie, E. I. (1986). Genus *Leuconostoc* van Tieghem 1878. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, et J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* 1071-1075. Baltimore: Williams and Wilkins.

Gendrot, F., Foucaud-Scheunemann, C., Ferchichi, M et Hemme, D. (2002). Characterization of amino acid transport in the dairy strain *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CNRZ 1273. *Appl. Microbiol.* 35: 291-295.

- Germain-Alpettaz, V et Foucaud-Scheunemann, C. (2002). Identification and characterization of an oligopeptide transport system in *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* CNRZ 1463. *Appl. Microbiol.* 35:68-73.
- German, B., Schiffrin, E. J., Renerio, R., Mollet, B., Pfeifer, A et Neese, J. R. (1999). The development of functional foods: Lessons from the gut. *Biotechnol.* 17: 492-499.
- Ghazi, F., Benmechernene, Z., Aggad, H., Guessas, B., Moussa-Boudjamaa, B., Henni, D.E et Mebrouk, K. (2006); Phenotypic identification and whole cell protein analysis by SDS-PAGE of dominant lactic acid bacteria isolated from Algerian raw milk. *J. Alg des Région Arides*, 05: 11-22.
- González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J.M., Fresno, J.M et Tornadijo, M.E. (2007): Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control* 18: 716-722
- Gopal, P. K., Davey, G. P., Crow, V. L., Pillidge, C. J., Coolbear, T et Holland, R. (1996). Extracellular material from *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* mediates the aggregation of lactococcal cells: Implications for the isolation of single strains. *J. Appl. Bacteriol.* 81:48-56.
- Grossiord, B., Vaughan, E. E., Luesink, E et de Vos, W. M. (1998). Genetics of galactose utilisation via the Leloir pathway in lactic acid bacteria. *Le Lait*, 78 : 77-84.
- Gueguen, Y., Chemardin, P., Labrot, P., Arnaud, A et Galzy, P. (1997). Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from a new strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from cassava. *J. Appl. Microbiol.* 82, 469-476.
- Gurtler, V et Mayall, B. C. (2001). Genomic approaches to typing taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 51: 3-16.
- Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire, Ed. Dunod, Paris, 1998 .
- Guessas B et Kihal M. (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk.
- Guessas B, 2007: Les particularités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus* .Thèse de doctorat. Université d'Oran.

H

- Hahn, G., Kaup, B., Bringer-Meyer, S., et Sahm, H. (2003). A zinc-containing mannitol-2-dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291: Purification of the enzyme and cloning of the gene. *Archives of Microbiol.* 179:101-107.
- Hamama, A., N. El Hankouri et El Ayadi, M. (2002). Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. *Int. Dairy J.*, 12 :933-938.
- Hamasaki, Y., Ayaki, M., Fuchu, H., Sugiyama, M et Morita, H. (2003). Behavior of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from spoiling cooked meat products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3668-3671.
- Hamdy, M. K et Williams, F. S. (2001). Bacterial amelioration of bauxite residue water of industrial alumina plants. *J. Ind Microbiol. Biotechnol.* 27, 228-233.
- Hammes, W.P et Hertel, C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Chap. 1.2.10. In prokaryotes. 4:320-403.
- Héchar, Y., Berjeaud, J. M et Cenatiempo, Y. (1999). Characterization of the mesB gene and expression of bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Current Microbiol.* 39 : 265-269.
- Héquet, A., Laffitte, V., Simon, L., De Sousa-Caetano, D., Thomas, C., Fremaux, Ch et Berjeaud, J-M, (2007): Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei*. 2512 on meat. *Int J Food Microbiol*, 113: 67-74

Herreros, M. A., Fresno, J. M., Gonzalez Prieto, M. E et Tornadijo, M. E. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Int. Dairy J.* 13: 469-479.

Holt, S. M., Al-Sheikh, H et Shin, K. J. (2001). Characterization of dextran-producing *Leuconostoc* strains. *Appl. Microbiol.* 32: 185-189.

Horsburgh, M. J., Wharton, S. J., Karavolos, M., et Foster, S. J. (2002). Manganese: Elemental defence for a life with oxygen. *Trends in Microbiol.* 10:496-501.

Huang, D. Q., Prevost, H et Diviés C. (1994). Principal characteristics of α -galactosidase from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. *J. Basic Microbiol.* 34:87-95.

Hugas, M., Garriga, M et Aymerich, MT. (2003). Functionality of enterococci in meat product. *Int. J. Food Microbiol.* 88(2-3): 22-33

Hyun-Ju, E., Dong, M.S et Nam, S. H.(2007): Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* spp. producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. *Int J Food Microbiol.* 117: 61-67

I

Ignacio Sanchez, J., Martínéz, B et Rodriguez, A.(2005). Rational selection of *Leuconostoc* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 105:377- 387.

J

Jack, R.W., Tag, G.R et Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59:171-200.

Jay, I.M.(2000). Fermentation and fermented dairy product. *Modern food Microbiol.* 6: 113-130.

Jordan, K. N et Cogan, T. M. (1995). Growth and metabolite production by mixed-strain starter cultures. *Irish J. Agric. Food Res.* 34:39-47.

Juillard, V., Foucaud, C., Flambard, B., Furlan, S., Bellengier, et Richard, J. (1998). Interactions entre bactérie mésophiles rôle des facteurs nutritionnels. *Le Lait*, 78 : 91-97.

K

Katz, M., Medina, R., Gonzalez, S et Oliver, G. (2002). Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk and cheese. *J. Food Protection*, 65: 1997-2001.

Kawasaki, H., Nakamura, N., Ohmori, M et Sakai, T. (1996). Cloning and expression in *E. coli* of sucrose phosphorylase gene from *Leuconostoc mesenteroides* No. 165. *Biosci. Biotechnol. Bioch.* 60:322-324.

Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A et Zinedine, A.(2006). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol. Res.* 10:10-16 .

Kempler, G.M et Mc Kay, L.L. (1980). Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis*", *J. Appl. Environ. Microbiol.* 39: 956- 927.

Kihal, M, Henni J, H.. Prevost et Diviés. C (2006) .A new manometric method for measuring carbon dioxide production by dairy starter culture: a cause of *Leuconostoc mesenteroides*. *Int. African J. Biotechnol.* Vol.5 (4): 378-383.

Kihal, M, (1996). Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides*, élément d'application en technologie fromagère type fromage bleu Thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Oran.

Kihal, M., Prevost, H., Lhotte, M.E., Huang, D.Q et Divies, C. (1996) .Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *Appl. Microbiol.* 22 : 219-223.

Kim, D. S., Thomas, S et Scott-Fogler, H. (2000). Effect of pH and trace minerals on log-term starvation of *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:976-981.

Konings, W. N. (2002). The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82 :32-7.

L

- Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachoui, M. et Ouhssine, M. (2005) : Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 144 : 237-250.
- Lachance, M. (2000) : Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par *Lactococcus Lactis* supsp. *Lactis* MJC15. Mémoire (MSc.) Faculté des études supérieures de l'université Laval.
- Lamberet, G., Auburger, B. et Bergère, J. L. (1997). Aptitude of cheese bacteria for volatile S-methyl thioester synthesis. II. Comparison of coryneform bacteria, Micrococcaceae and some lactic acid bacteria starters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:393-397.
- Larpent, J.P. (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens. Editions *Te et Doc*. 01 : 166-178.
- Leveau, J.Y., Bouix, M. et De Roissart, H. (1991). La flore lactique. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Lavoisier *Tec et Doc*. Paris. 3: 157-
- Limonet, M., Revol-Junelles, A. M. et Milliére, J. B. (2002). Variations in the membrane fatty acid composition of resistant or susceptible *Leuconostoc* or *Weissella* strains in the presence or absence of mesenterocin 52A and mesenterocin 52B produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2910-2916.
- Liu, S. Q., Asmundson, R. V., Holland, R. et Crow, V. L. (1997). Acetaldehyde metabolism by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* under stress conditions. *J. Int. Dairy*. 7: 175-183.
- Liu, S. Q., Holland, R. et Crow, V. L. (2003a). The potential of dairy lactic acid bacteria to metabolise amino acids via non-transaminating reactions and endogenous transamination. *Int. J. Food Microbiol.* 86:257-269.
- Liu, S. Q., Holland, R. et Crow, V. L. (2003b). Ester synthesis in an aqueous environment by *Streptococcus thermophilus* and other dairy lactic acid bacteria. *Appl Microbiol. Biotechnol.* , 63:81-88.

M

- Macedo, A. C., Vieira, M., Poças, R. et Malcata, F. X. (2000). Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. *Int. J. Dairy* 10: 769-774.
- Martinez-Murcia, A.J. et Collins, M.D. (1991). A phylogenetic analysis of an atypical *Leuconostoc*: Description of *Leuconostoc fallax* sp. nov. *J. Microbiol.* 82 :55 -60.
- Martley, F. G. et Crow, V. L. (1993). Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *Int. J. Dairy* 3:461-483.
- Martley, F. G. et Crow, V. L. (1996). Open texture in cheese: The contributions of gas production by microorganisms and cheese manufacturing practices. *J. Dairy Res.* 63:489-507.
- Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., Gonzalez, J., Rebollo, J. E. et Caceres, P. (2002). Ibores goat's milk cheese: Microbiological and physiochemical changes throughout ripening. *Le Lait*. 82 :579-587.
- Masle, I. et Morgan, F., (2001) : Aptitude de lait de chèvre à l'acidification par les ferments lactiques : facteurs de variation liés à la composition du lait, *Le lait*, 81 : 561-569.
- Mathot, A. G., Kihal, M., Prévost, H. et Diviés, C. (1994). Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar medium. *Int. J. Dairy*, 4:459-469.
- Mauriello, G., Moio, L., Moschetti, G., Piombino, P., Addeo, F. et Coppola, S. (2001). Characterization of lactic acid bacteria strains on the basis of neutral volatile compounds produced in whey. *J. Appl. Microbiol.* 90: 928-942.
- Mayeux, J.V., Sandine, W.W.E. et Elliker, P.R., (1962): A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures". *J. Dairy.Sci.* 45:655-656.
- McSweeney, P. L. H. et Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening. A review. *Le Lait*, 80 : 293-324.
- Meyers, S. A., Cuppett, S. L., et Hutkins, R. W. (1996). Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. *Food Microbiol.* 13:383-389.

Millière, J.B., Mathot, A.G., Schmitt, P et Diviès, C. (1989). Phenotypic characterization of *Leuconostoc* species. *J. Bacteriol.* 67:529-542.

Monchois, V., Willemot, R. M et Monsan, P. (1999). Glucansucrases: Mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiol. Rev.* 23:131-151.

Morisset, D et Frère J. (2002). Heterologous expression of bacteriocins using the mesentericin Y105 dedicated transport system by *Leuconostoc mesenteroides*. *Bioch.* 84 : 569-576.

Mor-Mur, M., Carretero, C., Pla, R et Guamis, B. (1994). Microbial changes during ripening of Cendrat del Montsec, a goat's milk cheese. *Food Microbiol.* 11:177-185.

Moulay, M. (2005) : Etude de la flore lactique protéolytique du lait cru de chèvre de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée (LMA). Thèse de magister. Université d'Oran Es-Senia

Moulay, M., Aggad, H., Benmechernene, Z., Guessas, B., Henni, D.E et Kihal, M. (2006): Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity.

O

Ogier, J.-C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P et Delacroix-Buchet, A. (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3691-3701.

Olivares-Illana, V., Wachter-Rodarte, C., Le Borgne, S et Lopez -Munguia, A. (2002). Characterization of cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *J. Industrial Microbiol Biotechnol.* 28: 112-117.

Orla Jensen (1919). The lactic acid bacteria Hostetson, Copenhagen. *Sci.* 5:81-196

Osmanagaoglu, O. (2007): Detection and characterization of Leucocin OZ, a new *anti-listerial* bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* with a broad spectrum of activity. *Food Control* 18 :118-123

O'Sullivan, S. M., Condon, S., Cogan, T. M et Sheehan, D. (2001). Purification and characterisation of acetolactate decarboxylase from *Leuconostoc lactis* NCW1. *FEMS Microbiol Letters.* 194:245-249.

Ouwehand, A. C., Bianchi Salvadori, B., Fonden, R., Mogensen, G., Salminen, S et Sellars, R. (2003). Health effects of probiotics and culture-containing dairy products in humans. *FIL/IDF Bulletin.* 380:4-19.

P

Park, I. S et Walsh, C. T. (1997). D-Alanyl-d-lactate and d-alanyl-d-alanine synthesis by d-alanyl-d-alanine ligase from vancomycin resistant *Leuconostoc mesenteroides*. Effects of a phenylalanine 261 to tyrosine mutation. *J. Bio. Chem.* 272:9210-9214.

Pepe, O., Blaiotta, G., Moschetti, G., Greco, T., et Villani, F. (2003) : Rope-producing strains of *Bacillus spp.* from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2321-2329.

Perez, G., Cardell, E et Zarate, V. (2002). Random amplified polymorphic DNA analysis for differentiation of *Leuconostoc mesenteroides* subspecies isolated from Tenerife cheese. *J. Appl. Microbiol.* 34 :82 -85.

Phalip, V., Dartois, V., Schmitt, P et Diviès, C. (1994). Cloning of the d -lactate dehydrogenase gene from *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*. *J. Biotechnol.* 16 :221-226.

Plihon, F., Taillandier, F et Strehaiano, P. (1995). Oxygen effect on batch cultures of *Leuconostoc mesenteroides*: Relationship between oxygen uptake, growth and end-products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:117-122.

Prévost, H., Phalip, V., Huang, D.Q et Diviés, C. (1993). Metabolism physiological behaviour of *Leuconostoc dextranicum* subsp. *mesenteroides* growing on raffinose. *J. Basic Microbiol.* 33:433-441.

R

Rattray, F. P., Myling-Petersen, D., Larsen, D et Nilsson, D. (2003). Plasmid-encoded diacetyl (acetoin) reductase in *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:304-311.

Reeson, A. F., Jankovic, T., Kasper, M. L., Rogers, S et Austin, A.D. (2003). Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germanica*. *Insect Mol. Biol.* 12:85-91.

Revol-Junelles, A. M., et Lefévre, G. (1996). Purification and N-terminal amino acid sequence of dextranin 24, a bacteriocin of *Leuconostoc* sp. *Current Microbiol.* 33:136-137.

Ringo, E et Gatesoupe, F. J. (1998). Lactic acid bacteria in fish. *Rev. Aquaculture.* 160 :177-203.

Robinson, R. K., Tamime, A. Y et Wszolek, M. (2002). Microbiol of fermented milks. R. K. Robinson (Ed.), *Dairy Microbiol handbook: the Microbiol of milk and milk products* pp:367-430. New York: Wiley.

Barrangou, R., Sung-Sik, Y., Breidt, Jr.F., Fleming, H. P et Klaenhammer T. R. (2002). Identification and characterization of *Leuconostoc fallax* strains isolated from an industrial Sauerkraut fermentation. *Appl and Environ. Microbiol.* 68:2877-2884.

Rodriguez, E., Calzada, J., Arqués, J.L., Rodriguez, J.M., Nunez, M et Medina, M., (2005). Antimicrobial activity of Pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157 :H7 in cheese. *Int. J. Dairy.* 15 :51-57

Rodriguez, J., Saavedra, J., Fernandez-Jurado, A et Prados, D. (1999). *Leuconostoc pseudomesenteroides* bacteremia. *Sangre (Barcelona)*. 44 :82-83.

Roy, D.(1996). Les probiotiques :Des bactéries bienfaisantes. *Diététique en action*.15-20.

S

Sakamoto, M., Uchimura, T et Komagata, K. (1996). Comparison of H₂O-forming NADH oxidase from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NRIC 1541^T and H₂O₂-forming NADH oxydase from *Sporo Lactobacillus inulinus* NRIC 1133^T. *J. Bioferm. Bioengin.* 82:531-537.

Salotra, P., Singh, D. K., Seal, K. P., Krishna, N., Jaffe, H et Bhatnagar, R. (1995): Expression of DnaK and GroEL homologs in *Leuconostoc mesenteroides* in response to heat shock, cold shock or chemical stress. *FEMS J.Microbiol.* 131:57-62.

Sambrook, J., Fritsh, E.F et Maniatis, T. (1986). Molecular cloning: A laboratory manual .Cold spring harbor laboratory Bress, 2nd (Ed):p96.

Samelis, J., Maurogenakis. F et Metaxopoulos, J. (1994). Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented greek dry salami. *Int. J. food Microbiol.* 23:179-196.

Sameshima, T., Magome, C., Takeshita, K., Arihara, K., Itoh, M et Kondo, Y. (1998). Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Saphylococcus aureus* in fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.* 41:1-7.

Schmitt, P., Vasseur, C., Phalip, V., Huang, D. Q., Diviés, C et Prévost, H. (1997). Diacetyl and acetoin production from the cometabolism of citrate and xylose by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 47:715-718.

Stiles, M.E. (1994). Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. *J Dairy Sci.* 27 :18-2724.

Stiles, M.E et Holzapfel W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. of food Microbiol.* 36: 1-29.

Susiluoto, T., Korkeala, H et Bjorkroth, K. J. (2003). *Leuconostoc gasicomitatum* is the dominating lactic acid bacterium in retail modified-atmosphere-packaged marinated broiler meat strips on sell-by-day. *Int. J. Food Microbiol.* 80:89-97.

Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M. H. N et Hugenholtz, J. (2003). Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:452-458.

T

Tagg, J. R et Mc Given, A. R. (1971): Assay system for bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 21 : 934

Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T et Mierau, I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *J.Dairy Sci.*82:2530-2535.

Tavaria, F. K et Malcata, F. X. (2003). Enzymatic activities of non-starter lactic acid bacteria isolated from a traditional Portuguese cheese. *Enzy. Microbiol Technol.*332:36-243.

Teale, C. J. (2002). Antimicrobial resistance and the food chain. Symposium Series of the Society of *Appl Microbiol.*31:85S-89S.

Thomas, T.D., (1973).Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the other bacteria. *N.Z.J. Dairy. Sci. Tech.* 8:70-71.

Thomas, L. V., Clarkson, M. R et Delves-Broughton, J. (2000): Nisin. In A. S. Naidu (Ed.), Natural food antimicrobial systems:463-524. Boca Raton: CRC Press.

Thompson ;(1989). *FEMS Microbiol. Rev.*46:245-268

Turnubrull, P.C., Jorgensen, B.K., Karnner J.M., Gelbert R.L et Parry J.M.(1973):Seveur clinical condition associated with *Bacillus cereus*. *J. of linical. Pathol.* pp32.

V

Vaughan, E. E., David, S., Harrington, A., Daly,C., Fitzgerald, G.F et de Vos, W.M. (1995) :Characterization of plasmid-encoded citrate permease (citP) genes from *Leuconostoc* species reveals high sequence conservation with the *Lactococcus lactis* citP gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 :3172 –3176.

Vedamuthu, E. R. (1994). The dairy *Leuconostoc*: Use in dairy products. *J. Dairy Sci.*77:2725-2737.

von Weymarn, N., Hujanen, M et Leisola, M. (2002a). Production of d-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochem.* 37:1207-1213.

von Weymarn, N., Kiviharju, K., et Leisola, M. (2002). High-level production of d-mannitol with membrane cell-recycle bioreactor. *J.Industrial Microbiol. Biotechnol.*29: 44-49.

W

Winters, D. A., Poolman, B., Hemme, D et Konings, W. N. (1991). Branched-chain amino acid transport in cytoplasmic membranes of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. dextranicum CNRZ 1273. *Appl.Environ. Microbiol.* 57:3350-3354.

Wuytack, E. Y., Diels, A. M. J et Michiels, C. W. (2002). Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.*77: 205-212.