

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie
Option : Microbiologie Alimentaire santé

Thème

Étude de l'effet antibactérien et
antifongique de trois souches de
Leuconostoc mesenteroides.

Présenté par :

M^{elle} IHADJERENE Anissia

M^{elle} SADJI Sofia

Membres du jury :

Président : M^r. BENDJEDDOU K.

Promotrice : M^{me} FARADJI S.

Examineurs : M^{me} BENACHOUR K.

M^{lle} TITELLI F.

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements tout d'abord au « Bon Dieu » pour la patience et la santé qui nous ont été indispensable tout au long de notre parcours et à nos chers parents sans qui rien n'aurait été possible.

Nos vifs remerciements s'adressent :

Au professeur SADOUN D. Pour nous avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi que pour ses précieux conseils et orientations. Qu'elle veuille bien agréer notre profonde et éternelle gratitude.

A notre chère promotrice M^{me} FARADJI S. pour ses orientations, ses conseils, ses encouragements et pour la confiance qu'elle nous a témoigné. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

Nos remerciements s'adressent aussi

A M^r. BENDJEDDOU K. pour avoir accepté d'honorer le jury d'examination en le président.

A M^{me} BENACHOUR K. et M^{lle}. TITELLI F. pour l'honneur qu'elles nous ont fait en examinant notre travail et pour le temps et l'attention qu'elles ont bien voulu nous consacrer

A tous les membres du Laboratoire de Microbiologie Appliquée et particulièrement à l'équipe de microbiologie du lait et probiotiques.

A tous ceux que nous n'avons pas cités et nous ont pourtant aidé.

Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce travail à :

*Mes très chers parents qui m'ont beaucoup soutenu et encouragé
« Que dieu les protège » ;*

*Mon cher frère, à toute ma famille surtout à mes amies qui ce
reconnaitrons ;*

Mon binôme

*Tous les étudiants de la promotion Microbiologie Alimentaire
Santé 2012/2013*

Anissia



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents pour leur amour, leur soutien et leur stimulante fierté. les mots sont insuffisants pour exprimer la force de mes sentiments et la reconnaissance que je leurs porte ;

Mon très cher frère Moukhtar ;

Ma très chère sœur Louiza ;

Mes grands parents ;

Mes cousins, cousines, oncles et tentes ;

Mon binôme, à mes amis ainsi qu'à tous les étudiants de la promotion Microbiologie Alimentaire Santé 2012/2013 ;

Tous ceux qui me sont chers.

Sofia

Liste des abréviations

BL : Bactéries Lactiques

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

E.coli : *Escherichia coli*

EPS : ExoPolySaccharides

FAO : Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

GRAS: Generally Recognized As Safe

IL-12 : Interleukines 12

IFN- γ : Interféron- γ

Lc : *Lactococcus*

Ln : *Leuconostoc*

Ln25 : *Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris 25*

LnAL3 : *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides AL3*

Ln37 : *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides 37*

NSLAB: Non-Starter Lactic Acid Bacteria

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

Str: *Streptococcus*

S: *Sataphylococcus*

Th1: cellules T CD4+ helper

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i> d'après Axelsson, 2004	4
Figure 2 : Adhésion des <i>Leuconostocs</i> sur des moules de grès vitrage, observé sous microscope électronique à balayage.....	9
Figure 3 : Schémas de standardisation des <i>inocula</i> des souches tests.....	18
Figure 4 : Schémas de standardisation des <i>inocula</i> des souches cibles.....	20
Figure 5 : Protocole de la réalisation du test des spots.....	23
Figure 6 : Résultats de la coloration de Gram.....	28
Figure 7 :Les caractères culturaux observés	29
Figure 8 : Résultats du test des spots.....	33
Figure 9 : Résultats de l'activité antimicrobienne des 3 souches de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (Test des spots).....	34
Figure 10 : Résultats du test des puits des surnageants natifs.....	36
Figure 11 : Résultats du test des puits des surnageants concentrés 4 fois.....	37
Figure 12 : Résultats du test des puits des surnageants concentrés 10 fois.....	38
Figure 13 : Résultats de l'activité antimicrobienne des surnageants concentrés 4 fois de la culture des souches LnAL3 et Ln37 (test des puits).....	39
Figure 14 : Résultats de l'activité antimicrobienne des surnageants concentrés 10 fois de la culture des souches LnAL3 et Ln37 (test des puits).....	40
Figure 15 : Résultats du test d'acidité.	42
Figure 16 : Étude de l'effet du pH sur l'activité antimicrobienne des surnageants concentrés 10 fois de la culture de la souche LnAL3.....	43

Figure 17 : Étude de l'effet du pH sur l'activité antimicrobienne des surnageants concentrés 10 fois de la culture de la souche Ln37.....	44
Figure 18 : Résultats du test des protéases	46
Figure 19 : Étude de l'effet des protéases sur l'activité antimicrobienne des surnageants concentrés 10 fois de la culture des souches Ln37 et LnAL3.....	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Espèces incluses dans le genre <i>Leuconostoc</i> (Hemme et al, 2004).....	8
Tableau II : Bactériocines produites par des bactéries du genre <i>Leuconostoc</i> (<i>Ln</i>).....	13
Tableau III : Conditions de cultures pour la vérification de la pureté des souches.....	15
Tableau IV : Liste des antibiotiques utilisés.....	21
Tableau V : Caractéristiques des souches utilisées.....	27
Tableau VI : Résultats de la standardisation des <i>inocula</i> des souches tests.....	30
Tableau VII : Résultats de la standardisation des <i>inocula</i> des souches cibles.....	30
Tableau VIII : Résultats de l'étude de la sensibilité des souches de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> vis-à-vis des antibiotiques.....	30
Tableau IX : Résultats de l'étude de la sensibilité des souches pathogènes vis-à-vis des antibiotiques.....	31

TABLEAU EN ANNEXES

Tableau I : Caractéristiques de quelques bactéries lactiques

Tableau II: Caractéristiques phénotypiques de différenciation des souches de *Leuconostoc mesenteroides subsp.*

Tableau III: Caractéristiques générales des contaminants des denrées alimentaires.

Tableau IV : Matériel et appareillage utilisés au cours de l'expérimentation.

Tableau V : pH des cultures de 18h des souches de *Ln mesenteroides*.

Tableau VI : pH des cultures de 18h des souches pathogènes.

Tableau VII: Normes pour la lecture de la sensibilité des souches aux antibiotiques (CASFM, 2012)

Tableau VIII : Résultats du test des spots.

Tableau IX : pH des surnageants natifs des souches de *Ln mesenteroides*.

Tableau X : Résultats du test des puits avec le surnageant natif

Tableau XI : Résultats du test des puits avec le surnageant concentré 4 fois.

Tableau XII : pH des surnageants concentré 10 fois des souches de *Ln mesenteroides*.

Tableau XIII : Résultats du test des puits avec le surnageant concentré 10 fois.

Tableau XIV: Résultats du test des puits avec le surnageant concentré 10 fois neutralisé.

Tableau XV: Préparation des solutions tampon.

Tableau XVI : Résultats de l'étude de l'effet pH du surnageant concentré 10 fois traité avec des protéases chauffé à 80°C.

Tableau XVII : Résultats de l'étude de l'effet pH du surnageant concentré 10 fois traité avec des protéases chauffés à 100°C.

Tableau XVIII : Zones d'inhibitions obtenues avec les différents témoins

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

PARTIE SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Les bactéries lactiques

1. Caractéristiques générales des bactéries lactiques	2
2. Habitat.....	3
3. Diversité des bactéries lactiques.....	3
4. Taxonomie des bactéries lactiques.....	4
5. Utilisation des bactéries lactiques.....	4

Chapitre II : Les leuconostocs

1. <i>Leuconostoc</i>	6
2. Caractères généraux.....	6
2.1 Caractères morphologiques et culturaux.....	6
2.2 Caractères biochimiques et physiologiques.....	6
2.3 Métabolisme des leuconostocs.....	7
3. Taxonomie.....	7
4. Habitat.....	8
5. Rôles technologiques des leuconostocs.....	9
5.1 Production de gaz (CO ₂)	9
5.2 Production d'Aromes	10
5.3 Production de polysaccharides.....	10

6. Intérêt prébiotique et probiotique.....	11
7. Les leuconostocs comme bioconservateurs.....	12

Chapitre III : Les contaminants des denrées alimentaires

1. Les contaminants des denrées alimentaires.....	14
--	-----------

PARTIE PRATIQUE

Partie I : Matériel et méthodes

1. Origine des souches utilisées	15
1.1. Revivification des souches	15
1.2. Vérification de la pureté des souches.....	16
2. Standardisation de l'<i>inoculum</i> bactérien.....	16
2.1. Préparation des <i>inocula</i> standards des souches tests.....	16
2.2. Préparation des <i>inocula</i> standards des souches cibles.....	19
3. Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques	21
4. Recherche <i>in vitro</i> de l'activité antimicrobienne des souches de <i>Leuconostoc</i> à l'égard de souches pathogènes sur milieu solide.....	22
4.1.Méthode des spots.....	22
4.2.Méthode des puits	24
5. Recherche de l'origine de l'activité antimicrobienne.....	25
5.1 Test d'acidité.....	25
5.2 Test des protéases.....	25
5.3 Test de thermorésistance.....	26

Partie II : résultats et discussion

1. Résultats de la vérification de la pureté des souches	27
2. Standardisation des <i>inocula</i>	29
3. Résultats de l'étude de la sensibilité des souches de <i>Leuconostoc ssp.</i> et des pathogènes vis-à-vis des antibiotiques	30
4. Recherche <i>in vitro</i> de l'activité antimicrobienne des souches de <i>Leuconostoc ssp.</i> à l'égard des souches cibles sur milieu solide.....	32
4.1 Test des spots.....	32
4.2 Test des puits	35
5. Résultats de la recherche de l'origine de l'activité antimicrobienne.....	42
5.1. Test d'acidité.....	42
5.2. Test des protéases	45
Conclusion	49

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Actuellement, l'utilisation des additifs conservateurs et des pesticides sont très répandus dans l'industrie agroalimentaire, afin d'accroître la durée de vie et l'amélioration de la sécurité sanitaire des produits alimentaires, ces derniers présentent un réel danger à long terme sur la santé des consommateurs, en effet ils peuvent être responsables d'effets secondaires tels que les nausées, l'hyperactivité voire même de maladies telles que l'asthme et voire des cancers (Ross et *al.*, 2002).

Sur ceux-ci la bioconservation des aliments est une méthode biologique qui fait l'objet depuis 40 ans de nombreuses études, se présente comme le meilleur moyen pour réduire, voire remplacer l'utilisation de ces produits chimiques (Stiles, 1996 ; Ross et *al.*, 2002,).

Dans ce contexte, les bactéries lactiques et/ou leurs métabolites (éthanol, peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, les composés antifongiques et les bactériocines) utilisés depuis des millénaires d'une façon empirique par de nombreuses populations, peuvent contribuer à la conservation des aliments (Ross et *al.*, 2002,).

Les bactériocines des bactéries lactiques sont déjà largement utilisées par l'industrie agroalimentaire pour leurs propriétés de bioconservation (Gálvez et *al.*, 2011).

L'importance des souches du genre *Leuconostoc* présent dans la technologie des produits laitiers, est reconnue, en association avec des Lactocoques et parfois d'autres bactéries lactiques, ils fermentent le citrate présent dans le lait pour produire le diacétyle qui est la principale source d'arôme et de goût des produits laitiers fermentés tels que le beurre, le fromage (Levata-jovanovic et Sandine, 1997).

Cependant les souches de *Leuconostoc* sont également reconnues pour la production de composés antimicrobiens contre les micro-organismes pathogènes et d'altération. L'activité inhibitrice est généralement attribuée à l'action des acides organiques et aux peroxydes d'hydrogène qu'elles produisent (Parente et *al.*, 1996).

Peu d'informations sont disponibles sur la purification et la caractérisation des bactériocines produites par les *Leuconostoc* lactiques. En général les bactériocines produites ne sont pas nécessairement actives contre les bactéries lactiques, mais sont souvent actives contre *Listeria monocytogenes* agents pathogènes présents dans les aliments. (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004)

Dans ce contexte s'inscrit cette étude qui consiste, en premier lieu à l'étude *in vitro* de l'antagonisme de trois souches de *Leuconostoc mesenteroides* (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Cremoris* 25; *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* AL3 et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 37) envers un certain nombre de micro-organismes pathogènes et d'altérations, et en second lieu à la détermination de la nature de la substance responsable de l'effet antimicrobien.

1. Caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques constituent l'un des groupes incontournables de la microbiologie alimentaire. Connues depuis longtemps pour leur capacité de fermentation lactique, associées à de nombreux aliments fermentés (yaourts, saucisson, choucroute.....), leur participation à l'acquisition des propriétés nutritionnelles ou de la qualité sanitaire de l'aliment est plus récemment utilisée. Elles sont à ce titre généralement classées dans les flores technologiques, ce qui ne doit cependant pas occulter leurs implications dans les phénomènes d'altérations de certaines catégories de denrées alimentaires (Pilet et *al.*, 2005).

Les bactéries lactiques regroupent des germes très différents, aussi bien des coques (Appartenant aux genres: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc* et *Atopobium*) que des bacilles (appartenants aux genres *Lactobacillus* et *Carnobacterium*) (Morisset, 2002).

Les bactéries lactiques regroupent des bactéries à coloration de Gram positive, immobiles, généralement, asporulées et dépourvues de catalase (à l'exception de *Lactobacillus sakei* et *Lactobacillus plantarum*) et de cytochromes oxydases. Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle, elles constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique.

Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production liée à un métabolisme exclusivement fermentaire et de quantités importantes d'acide lactique à partir de sucres. Ce sont par ailleurs des bactéries dépourvues de nitrate réductase, anaérobies ou aérotolérantes, exigeantes en facteurs de croissance : acides aminés, les peptides, vitamines, les sels, acides gras, bases nucléiques et les glucides fermentescibles (Pilet et *al.*, 2005).

Les bactéries lactiques sont généralement mésophiles, certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent majoritairement à pH 4,0-4,5 et certaines sont encore actives à pH 3,2 ou à pH 9,6 (Baliarda, 2003).

Acidotolérantes, les bactéries lactiques sont capables de survivre dans des milieux très acides en raison de leurs productions d'acide lactique. De plus, l'acidification du milieu participe à l'inhibition de la croissance de certains microorganismes pathogènes, tels que *Listeria monocytogenes* (Makhloufi, 2012).

Elles ont des tolérances très variables vis-à-vis du sel. Elles possèdent une faible activité protéolytique et lipolytiques (Baliarda, 2003).

Du point de vue phylogénétique, les bactéries lactiques appartiennent à la branche *Clostridiale* des bactéries Gram positives, avec un G+C% inférieur à 55%. La taxonomie actuelle regroupe les principaux genres de bactéries lactiques en fonction de leur parenté phylogénétique : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* et *Pediococcus* d'une part *Streptococcus* (espèce *Thermophilus*), *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Carnobacterium* d'autre part (Pilet et al., 2005).

Enfin, les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se font attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe). Cependant, parmi elles quelques espèces du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* sont considérées comme des pathogènes opportunistes (Makhloufi, 2012).

2. Habitat

Les bactéries lactiques sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'Homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères (Makhloufi, 2012).

3. Diversité des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent de nombreux genres bactériens (Tableau I en annexe I, Figure 1). De plus, l'utilisation des séquences de gènes codant les ARN 16S et 23S a conduit à l'identification de nouveaux genres bactériens parmi des bactéries lactiques, tels que *Carnobacteria*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* issue d'une évolution taxonomique (Makhloufi, 2012).

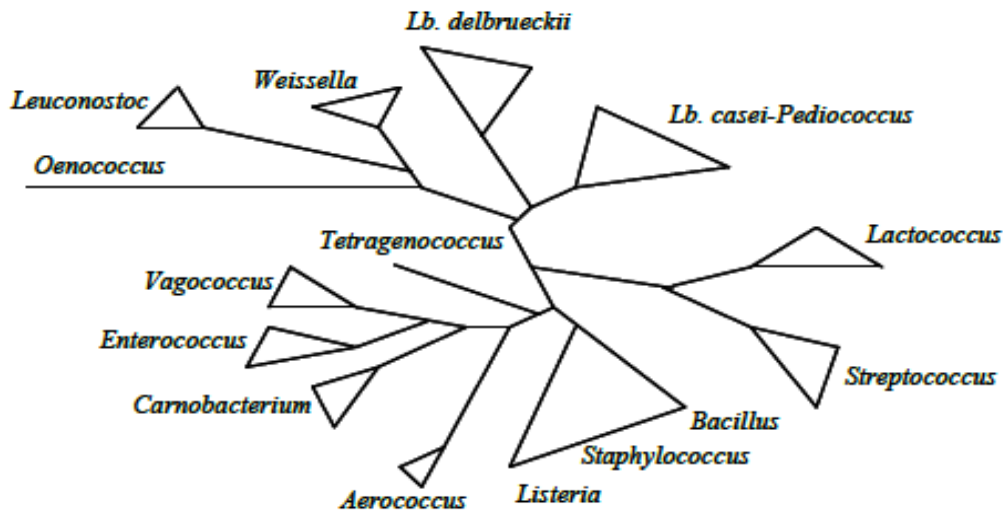


Figure 1 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* d'après Axelsson, 2004 (Makhloufi, 2012).

4. Taxonomie des bactéries lactiques

De nombreuses classifications des bactéries lactiques ont été proposées. Parmi elles, figure-celle-ci :

- Classification selon la composition de la paroi cellulaire bactérienne (d'Ambrosini et al. 1996), incluant la nature des acides gras (Gilarová et al. 1994).
- Une autre classification, basée sur les différents modèles de fermentation du glucose définit 3 groupes par Orla-Jensen : Le groupe I (exemple : *Lactobacillus*), Le groupe II (exemple : *Leuconostoc*), Le groupe III (exemple : *Enterococcus*) (McLeod et al. 2008).
- Une étude basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S et/ ou 23S des bactéries lactiques propose une classification en 3 groupes restreinte à certaines bactéries lactiques : groupe des *Leuconostoc*, groupe des *Lactobacillus delbrueckii* (*Lb. delbrueckii*) et groupe des *Lb. casei-pediococcus* (Rodrigues et al., 1991 ; Makhloufi, 2012).

5. Utilisation des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très utilisées dans l'industrie agroalimentaire. Elles peuvent fermenter une grande variété de substrats comme le lait, la viande, les végétaux et les céréales pour produire des aliments très divers: laits fermentés, fromages, saucissons et jambons secs, choucroute, olives, pain au levain, bières (Jiménez, 2008).

Les bactéries lactiques ont plusieurs rôles dans la production d'aliments fermentés. Elles modifient la saveur et la texture de l'aliment du fait de la production d'acide lactique au cours de leur croissance mais aussi celle de composés aromatiques comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le diacétyl (Jiménez, 2008).

Un autre rôle des bactéries lactiques est d'inhiber le développement de la flore bactérienne indésirable qu'elle soit pathogène ou d'altération. Cette inhibition passe par deux aspects : l'acidification qui inhibe la croissance des bactéries peu résistantes à un bas pH, et la synthèse de bactériocines, molécules bactéricides dont les spectres d'action sont variables : des bactéries à Gram + (exemple : nisine) à l'espèce productrice (Klaenhammer, 1988 ; Rammelsberg et *al.*, 1990 ; Penaud, 2006).

Certaines bactéries lactiques comme *Lactobacillus helveticus* sont utilisées pour produire industriellement de l'acide lactique employé comme additif en alimentation et dans les produits cosmétiques ou pharmaceutiques. L'acide lactique est aussi transformé en acide polylactique, polymère biorésorbable utilisé dans la fabrication d'implants pour la chirurgie osseuse ou pour la fabrication de films plastiques biodégradables. *Leuconostoc mesenteroides* est utilisé pour la production de dextran, médicament utilisé dans les cas d'hypovolémie sanguine (Penaud, 2006).

Enfin, les bactéries lactiques sont de plus en plus recherchées pour d'autres qualités nutritionnelles et thérapeutiques dans des préparations appelées probiotiques.

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte. (Définition du comité d'experts réunis par la FAO et l'OMS en 2001).

1. *Leuconostoc*

D'après la seconde édition du Bergey's manuel, le genre *Leuconostoc* a été défini en 1878 par Van Tieghem. Le terme vient du mot *leucus* qui signifie clair et de *nostoc* qui signifie algues le tout signifie « nostoc incolore » (Euzeby, 2009 ; Holzapfel et al., 2009).

2. Caractères généraux

Garvie décrit les caractéristiques du genre *Leuconostoc* dans la précédente édition du Bergey's manuel de bactériologie systématique (Garvie, 1986).

2.1 Caractères morphologiques et cultureux

Les cellules de *Leuconostoc* sont de forme ellipsoïdale à sphérique, souvent allongées, généralement en paires ou en chaînettes. Les cellules cultivées dans un milieu glucosé sont allongées et apparaissent morphologiquement plus proche des lactobacilles que des streptocoques. Dans le lait la plupart des souches possèdent une forme coccoïde. Lorsqu'il est cultivé sur un milieu solide, les cellules sont allongées et peuvent être confondues avec des tiges. Les colonies se développent habituellement seulement après 3 à 5 jours, elles sont lisses, rondes, blanche, grisâtre et moins de 1 mm de diamètre (Holzapfel et al., 2009; Säde, 2011).

2.2 Caractères biochimiques et physiologiques

Ils sont chimio-organotrophes, anaérobies facultatifs, non protéolytique, le nitrate n'est pas réduit, non hémolytique, l'indole n'est pas formé, l'arginine n'est pas hydrolysée et le lait n'est généralement ni acidifié ni caillé. Une autre caractéristique est la résistance à la vancomycine.

Bien que la croissance peut se produire à un pH de 4,5 les espèces sont non acidophiles et préfèrent un pH moyen initial de 6,5.

Leur croissance est toujours lente, les leuconostocs sont considérés comme des mésophiles psychrotrophes avec un optimale de croissance entre 14-30 °C. Les limites de température pour la croissance varient selon les espèces et les souches allant de 1 à 10 °C et de 30 à 40 °C. La capacité à se développer à basse température (4°C au moins) est particulièrement caractéristique des souches de *Ln. carnosum*, *Ln. gasicomitatum*, *Ln. gelidum* et *Ln. inhae* (Holzapfel et al., 2009 ; Säde,2011).

Les souches de *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* ont un temps de génération relativement court et une bonne croissance est obtenue au bout de 24 h d'incubation à 30 °C. Les cellules cultivées dans un bouillon contenant du glucose sont mortes au bout de 30 min à 55°C, mais peut résister au chauffage de 80°C à 85°C dans un milieu contenant du polysaccharide. Elles peuvent croître en présence de 3,0% (M / v) de NaCl. Certaines souches se développent en présence de 6,5% (M / v) de NaCl.

Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris peut nécessiter 48 heures d'incubation, et pousse de préférence à 22-30 °C. *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* se distingue facilement des autres espèces par la fermentation seule du glucose, du galactose, et du lactose (Holzapfel et al., 2009).

2.3 Métabolisme des leuconostocs

Les leuconostocs (tableau II en annexe I) sont les seuls bactéries en forme de coque à avoir un métabolisme hétérofermentaire : dans des conditions microaérophiles, le glucose est converti en des quantités équimolaires de D (-) lactate, d'éthanol et de CO₂ par l'intermédiaire d'une combinaison d'hexose-monophosphate (6-P-gluconate) et par la voie des pentoses phosphates. Toutefois, en présence d'oxygène, des souches de *Leuconostoc mesenteroides* utilisent NADH-oxydases et NADH-peroxydases comme mécanismes alternatifs pour régénérer le NAD. L'Acétate, au lieu de l'éthanol, et le double de la quantité d'ATP sont produits. Le fructose est fermenté par toutes les espèces de *Leuconostoc* sauf *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* et certaines souches de *Leuconostoc argentinum* (Cogan et Jordan, 1994 ; Holzapfel et al., 2009).

3. Taxonomie

Le genre *Leuconostoc* appartient au phylum des *Firmicutes*, la classe des *Bacilli*, l'ordre des *Lactobacillales*, la famille des *Leuconostocaceae* (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004 ; ,2004; Holzapfel et al., 2009; Säde, 2011).

Le genre *Leuconostoc* comprend, 11 espèces (tableau I) *Ln. mesenteroides* étant l'espèce type, incluant trois sous espèces pour ce dernier (*mesenteroides*, *dextranicum* et *cremoris*) (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004; Euzeby, 2009 ; Holzapfel et al., 2009).

Tableau I : Espèces incluses dans le genre *Leuconostoc* (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

Espèces de leuconostocs	Ancienne nomenclature
<i>Ln. mesenteroides subsp .cremoris</i>	
<i>Ln. mesenteroides subsp. dextranicum</i>	
<i>Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	
<i>Ln.lactis</i>	
<i>Ln.pseudomesenteroides</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.gasicomitation</i>	
<i>Ln.kimchi</i>	
<i>Ln.ficulneum</i>	
<i>Ln.fructosum</i>	<i>Lactobacillus fructosus</i>
<i>Ln.inhae</i>	

Les deux faits principaux relatifs aux leuconostocs ont été le reclassement de *Leuconostoc paramesenteroides* en *Weissella paramesenteroides* et *Leuconostoc oenos* a été assigné au genre *Oenococcus* comme *Oenococcus oeni* (Collins et al., 1993 ;Dicks et al., 1995).

4. Habitat

Les leuconostocs sont très répandus dans la nature; ils ont été isolés à partir de matière végétale et de racines qui constituent leur niche écologique naturelle (Hemme et Foucaud-scheunemann ,2004 ; Säde, 2011). Ils se développent bien dans différents produits végétaux fermentés, comme le concombre, le kimchi, le chou et les olives (Kim et Chun, 2005; Mäki, 2004).

Par conséquent, en raison de leurs présence dans le matériels de l'usine, ils sont fréquemment rencontrés dans les aliments d'origine animale, y compris le lait cru et les produits laitiers, la viande, la volaille, le poisson (Björkroth et Holzapfel, 2006).

Leurs présence est renforcée par leur particularité de survivre pendant une longue durée sur la surface des matériaux telles que l'adhésion aux moules (figure 2) ou à la pasteurisation (Devoyod et *al.*, 1993; Devoyod et Poullain, 1988).

Les souches de *Leuconostoc* sont considérées comme des bactéries lactiques de la flore secondaire (NSLAB) de la même manière que les lactobacilles mésophiles (Cogan, 2002 ; Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

Un nombre limité de *Leuconostoc* sont associés aux infections humaines ont été rapportés mais les souches associées sont considérées comme opportunistes pathogènes susceptibles d'infecter les individus immunodéprimés et le genre est «généralement reconnu comme sûr (GRAS).

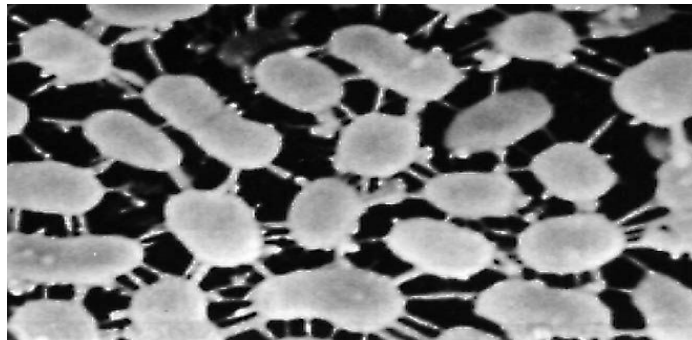


Figure 2 : Adhésion des leuconostocs sur des moules de grès vitrage, observé sous microscope électronique à balayage. Reproduit de Devoyod et Poullain (1988) avec l'autorisation de le Lait.

5. Rôles technologiques des leuconostocs

La fermentation lactique est l'une des plus anciennes formes de préparation alimentaires et de conservation. Les bactéries lactiques, y compris *Leuconostoc*, ont une longue histoire d'utilisation sûre dans la fermentation des aliments (choucroute, cornichons, viande, produits laitiers.. etc.) (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

5.1 Production de gaz (CO₂)

La production de CO₂ par les leuconostocs permet l'ouverture mécanique des fromages (en particulier les fromages à pâte persillée), Les souches sont ainsi sélectionnées pour leur production modérée de CO₂ pour éviter l'ouverture excessive (Vedamuthu, 1994; Martley et *al.*, 1996).

Ces ouvertures permettent également la colonisation avec le *Penicillium roqueforti* dans certains fromages, mais également impliquées dans la production de fromages hollandais mûries pressées comme Edam, Gouda et d'autres variétés de fromages salés (Hemme et Foucaud-scheunemann ,2004).

5.2 Production d'Aromes

Les composés majeurs liés à l'utilisation de *Leuconostoc* dans le domaine des produits laitiers est le diacétyl, l'acétate et l'éthanol qui contribuent à la formation de l'arôme (Vedamuthu, 1994; Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

Les ferments lactiques peuvent produire de l'Acétaldéhyde en excès dans le beurre et les laits fermentés, ce qui conduit au développement d'un défaut de gout appelé « gout d'herbe ». Sous réfrigération, *Leuconostoc* est capable d'y remédier en réduisant l'acétaldéhyde en éthanol, cette activité est élevée pour *Ln. mesenteroides subsp. cremoris* (Cogan et al., 1994 ; Hemme et Foucaud-scheunemann ,2004).

La combinaison des leuconostocs avec des ferments lactiques acidifiant de souches pures ou mixte de *Lactococcus lactis subsp. lactis* et/ou *Lc. lactis subsp. cremoris* est nécessaire pour potentialiser l'utilisation du citrate (Levata-jovanovic et Sandine, 1997).

5.3 Production de polysaccharides

Dans la technologie des produits laitiers, les dextrans, avec d'autres EPS produits par *Leuconostoc*, sont utilisés comme additifs alimentaires et agissent comme texturants par augmentation de la viscosité et en tant que stabilisants. Ils jouent un rôle reconnu dans la fabrication du lait fermenté, des crèmes desserts à base de lait et de lait aromatisé (Hemme et Foucaud-scheunemann ,2004).

Les-gluco-oligosaccharides produits par *Ln. mesenteroides NRRL-B-18242*, sont très résistants aux attaques des enzymes digestives. Ils ont été proposés pour avoir un effet prébiotique potentiel chez les nouveaux-nés et stimuleraient la croissance des bactéries bénéfiques de la flore intestinale (Djouzi et al., 1995 ; Chung et al., 2002).

6. Intérêt prébiotique et probiotique

Les leuconostocs sont utilisés :

- Comme probiotiques potentiels : leurs effets sur l'hôte à tendance à être faible car les leuconostocs ne colonisent pas le tractus intestinal, sauf en cas d'ingestion à des concentrations élevées de cellules.

Des études ont montrées que l'ingestion de lait fermenté contenant 10^8 g⁻¹ de *Lc. lactis* et de *Ln. mesenteroides* réduit la durée de la diarrhée moyenne de 0,3 jours chez les enfants (Agarwal et Bhasin ,2002 ; Hemme et Foucaud-scheunemann ,2004).

Les souches probiotiques de *Str. thermophilus* et de *Leuconostoc* sont des inducteurs puissants de cytokines de type Th1, IL-12 et IFN- γ par rapport aux souches de *Lactobacillus*. Les combinaisons bactériennes n'ont pas abouti à la production de cytokines améliorées (kekkonen et al., 2008).

- pour hydrolyser les α -galactosides, comme le raffinose des produits d'origine végétale, qui ne sont pas métabolisés ni par les humains ni par les animaux due à l'absence d'une α -galactosidase dans la muqueuse intestinale (Huanget al., 1994).
- pour synthétiser des analogues acarbose, ce qui peut améliorer le profil glycémique et la sensibilité à l'insuline chez les patients atteints de diabète de type 2 (Yoon & Robyt, 2002) ainsi que le mannitol qui est un sucre hypocalorique qui pourrait remplacer le saccharose, le lactose, le glucose ou le fructose dans les produits alimentaires (von Weymarn et al., 2002).
- pour produire des polymères d'inuline-grippaux, qui peuvent servir comme un prébiotique (Olivares et al., 2002).
- Pour la production de vitamines, les souches de *Ln. mesenteroides* produit des quantités significatives de menaquinones et il serait utile comme ferment pour les produits laitiers (et autres fermentations) ou des suppléments alimentaires diététiques empêchant les carences en la vitamine K (Morishita et al., 1999).

7. Les leuconostocs comme bioconservateurs

La bioconservation est définie comme l'utilisation de micro-organismes antagonistes et leurs métabolites à fin d'inhiber les microorganismes indésirables pour accroître la sécurité et la durée de vie d'un produit (Stiles, 1996 ; Sade, 2011).

La capacité de *Leuconostoc spp.* à promouvoir la sécurité et la qualité des aliments est liée aux acides organiques excrétés et à la baisse du pH et beaucoup d'autres composés antimicrobiens tels que le CO₂, le diacétyle et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Björkroth et Holzapfel, 2006; Sade, 2011).

En outre, la capacité de produire des bactériocines, peptides ayant des effets inhibiteurs sur d'autres bactéries lactiques et bactéries Gram positif étroitement liés, sont bien décrits pour *Leuconostoc spp.* (Tableau II). Peu d'informations sont disponibles sur la purification et la caractérisation des bactériocines produites par les leuconostocs d'origines laitiers, bien que leur production été impliquée dans cette dernières (Parente et *al.*, 1996; Hemme et Foucaud-scheuneman, 2004; Xiraphiet et *al.*, 2008).

Les bactériocines biochimiquement ou génétiquement caractérisée de *Leuconostoc spp.* se sont avérées stables à la chaleur, ne contenant pas de lanthionine, ni de peptides modifiés, la majorité d'entre eux sont classés comme peptides pediocin-like « classe IIa » (Cotter et *al.*, 2005 ; Sade, 2011).

Les Bactériocines de *Leuconostoc* ne sont pas nécessairement actifs contre les bactéries lactiques, mais sont actifs contre les bactéries pathogènes incluant en particulier *Listeria monocytogenes sp.* .Plusieurs études ont porté sur leurs propriétés anti-*Listeria* sur divers aliments, notamment la viande, le poisson, les fruits et légumes (Jeppesen et *al.*, 1993a; Jeppesen et *al.*, 1993b; Trias et *al.*, 2008).

La souche *Ln. carnosum 4010*, produit une leucocine A et une leucocine C, qui inhibe *L. monocytogenes*. Cette souche a été brevetée par l'Institut danois de recherche sur la viande et commercialisée en tant que culture bioprotectrice pour les produits de viandes emballés sous vide stockés au froid. En outre, les souches de *Ln. gelidum* (produisant leucocine A) et *Ln. mesenteroides* (une bactériocine non identifiée) sont connues pour inhiber les bactéries d'altération et de prolonger la durée de vie du bœuf emballé sous vide, saucisses et les fruits de mer (Matamoros et *al.*, 2009 ; Sade, 2011).

Tableau II: Bactériocines produites par des bactéries du genre *Leuconostoc* (*Ln*) (Holland et Liu, 2011).

Bactériocine	Bactérie productrice	Classe	Origine
Leucocine 4010 (A et B)	<i>Ln. carnosum</i> 4010	Ila	Viande
Leucocine A-UAL 187	<i>Ln. gelidum</i> A-UAL 187	Ila	Viande
Leucocine B-Ta11a	<i>Ln. carnosum</i> B-Ta11a	Ila	Viande
Leucocine A-TA33a	<i>Ln. mesenteroides</i> A-TA33a	Ila	Viande
Leucocine B-TA33a	<i>Ln. mesenteroides</i> B-TA33a	Ila	Viande
Leucocine C (-TA33a)	<i>Ln. mesenteroides</i> C (-TA33a)	Ila	Viande
Leucocine A(C7)	<i>Ln. pseudomesenteroides</i> QU15	Ila	Riz
Leucocine A-QU15	<i>Ln. pseudomesenteroides</i> QU15	Ila	Riz
Leucocine Q	<i>Ln. pseudomesenteroides</i> QU15	IId	Riz
Leucocine N	<i>Ln. pseudomesenteroides</i> QU15	IId	Riz
Leucocine H (α et β)	<i>Ln.</i> MF215B	I Ib	ND
Leuconocine J	<i>Ln. sp</i>	ND	Kimchi
Kimchicine GJ7	<i>Ln. citreum</i> GJ7	ND	Kimchi
Mésentérocine 52A	<i>Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides</i> FR52	IId	Lait
Mésentérocine 52B	<i>Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides</i> FR52	IId	Lait
Mésentéricine ST99	<i>Ln. mesenteroides subsp. dextranicum</i>	ND	Boza
Mésentéricine Y105	<i>Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides</i> Y105	Ila	Lait fermenté
Mésentéricine B105	<i>Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides</i> Y105	Ila	Lait fermenté
Mésentéricine 5	<i>Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides</i> UL5	ND	fromage cheddar

ND : non déterminé

1. Les contaminants des denrées alimentaires

Les microorganismes sont présents dans les écosystèmes naturels comme l'air, le sol et l'eau. Ils sont également présents sur l'homme lui-même et sur tous les êtres vivants animaux et végétaux. De ce fait, tous les produits alimentaires transformés ou non peuvent être contaminés par des microorganismes.

La contamination des denrées alimentaires peut avoir un effet plus ou moins graves sur la qualité du produit et sur la santé du consommateur. Elle peut être à l'origine d'une altération du produit, lui faisant perdre ces caractéristiques organoleptiques et/ou commerciales ; et parfois la cause d'intoxications ou toxi-infections graves (Perscott, 2003).

La flore d'altération causera des défauts sensoriels de goût, d'arôme, d'apparence ou de texture et réduira la vie du produit laitier. Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont *Pseudomonas sp.* ; *Proteus sp.* ; les coliformes principalement les genres *Escherichia et Enterobacter*, les sporulées telle que *Bacillus sp.*, et *Clostridium sp.* et certaines levures et moisissures (Vignola, 2002) (tableau III en annexe I). Les altérations des viandes et des volailles emballées sous film polyéthylène sont essentiellement liées au développement de *Pseudomonas ssp.* qui produit une odeur de putréfaction caractéristique et un enduit visqueux à la surface des carcasses (Baliarda, 2003).

La flore pathogène est responsable d'intoxications alimentaires. les principaux microorganismes pathogènes associées aux produits laitiers sont : *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia*, *Campylobacter jejuni* , *Shigella sone* et certaines moisissures (Vignola, 2002).

Le travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) équipe de microbiologie du lait et des probiotiques à l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, sous la direction de M^{me} Faradji S.

1. Origine des souches utilisées

Dans cette étude trois souches de *Leuconostoc mesenteroides* sont utilisées : *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* (Ln25), *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* (Ln37), *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* (LnAL3). Isolées et identifiées phénotypiquement et génotypiquement par M^{me} Faradji, puis conservées à – 20°C dans du bouillon MRS (Man, Rogosa et Sharpe) avec 20% de glycérol.

Douze souches pathogènes et d'altérations : *Staphylococcus aureus* (1), *Staphylococcus aureus* 2, *Escherichia coli* (1), *Escherichia coli* 2, *Escherichia coli* ATCC 22295 (3), *Enterobacter sp.*(1), *Enterobacter sp.*(2), *Salmonella enterica subsp arizona*, *Pseudomonas aeruginosa* (1), dont deux espèces de champignons phytopathogènes : *Aspergillus flavus* ATCC 36061, *Botrytis cinerea* et une espèce de levure : *Candida albicans*. Toutes les souches utilisées font partie de la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (Laboratoire de microbiologie de lait et des probiotiques) de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia. Elles ont été conservées à – 20°C sur bouillon nutritif (BN) avec glycérol. Cependant *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea* et *Candida albicans* font partie de la collection du laboratoire de Mycologie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia. Ils ont été conservés sur gélose Sabouraud incliné à 4 °C.

1.1. Revivification des souches

La revivification des souches consiste à plusieurs repiquages sur des milieux de culture appropriés puis à une incubation jusqu'à l'obtention de cultures fraîches.

Les trois souches de *Leuconostoc mesenteroides* sont repiquées dans 9 ml de bouillon MRS (pH 6,5) et incubées à 30°C pendant 24h dans une étuve (Memmert).

Les souches pathogènes sont repiquées dans 9 ml de BN (pH 7,4) et incubées à 37°C (à 30°C pour *Pseudomonas*, *Aspergillus flavus* ATCC 3606 et *Botrytis cinerea*) pendant 24h dans une étuve (Melag et Memmert respectivement).

1.2. Vérification de la pureté des souches

Avant toute utilisation des souches, une vérification de leur pureté est indispensable. Après quelques repiquages successifs, un ensemencement par stries sur des géloses appropriées est réalisé (Tableau III). Des tests rapides et simples permettent de vérifier la pureté des souches :

- Observation de l'aspect des colonies obtenues.
- Coloration de Gram. (en annexe II).
- Test de la catalase. (en annexe II).

Tableau III : Conditions de cultures pour la vérification de la pureté des souches

Souches utilisées	Milieu	T° d'incubation	Souches utilisées	Milieu	T° d'incubation
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Gélose MRS	30°C	<i>Salmonella enterica subsp arizona</i>	GN Gélose Salmonella-Shigella	37°C
<i>S.aureus</i>	Gélose nutritif (GN) Gélose chapman	37°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GN	30°C
<i>E.coli</i>	GN Gélose E.M.B	37°C	<i>Enterobacter sp.</i>	GN Eau peptonée exempté d'indol, bouillon BCPL	37°C
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Gélose Sabouraud	30°C	<i>Candida albicans</i>	Gélose Sabouraud	37°C

2. Standardisation de l'inoculum bactérien

Afin de travailler dans des conditions contrôlées en termes de population bactérienne, la standardisation des *inocula* est jugée indispensable.

2.1. Préparation des *inocula* standards des souches tests

Les souches de *Leuconostoc mesenteroides* sont repiquées dans 9ml de bouillon MRS et incubées à 30°C pendant 18h. (figure 3).

Après 18 heures d'incubation, un ensemencement en surface est réalisé sur le même milieu gélosé puis incubée à 30°C pendant 48h.

Au terme de cette dernière, six colonies bien isolées et bien distinctes ont été repiquées dans un tube à essai de 9 ml de bouillon MRS, puis incubées à 30°C pendant 18h.

Au terme de la période d'incubation, une série de dilution décimales allant jusqu'à 10^{-9} est effectuée, 1ml des 4 dernières dilutions sontensemencées en masse dans une gélose MRS à raison de 2 boîtes par dilution. Après incubation à 30°C pendant 48h on procède au dénombrement des colonies en utilisant un compteur de colonie (suntex colony counter 570).

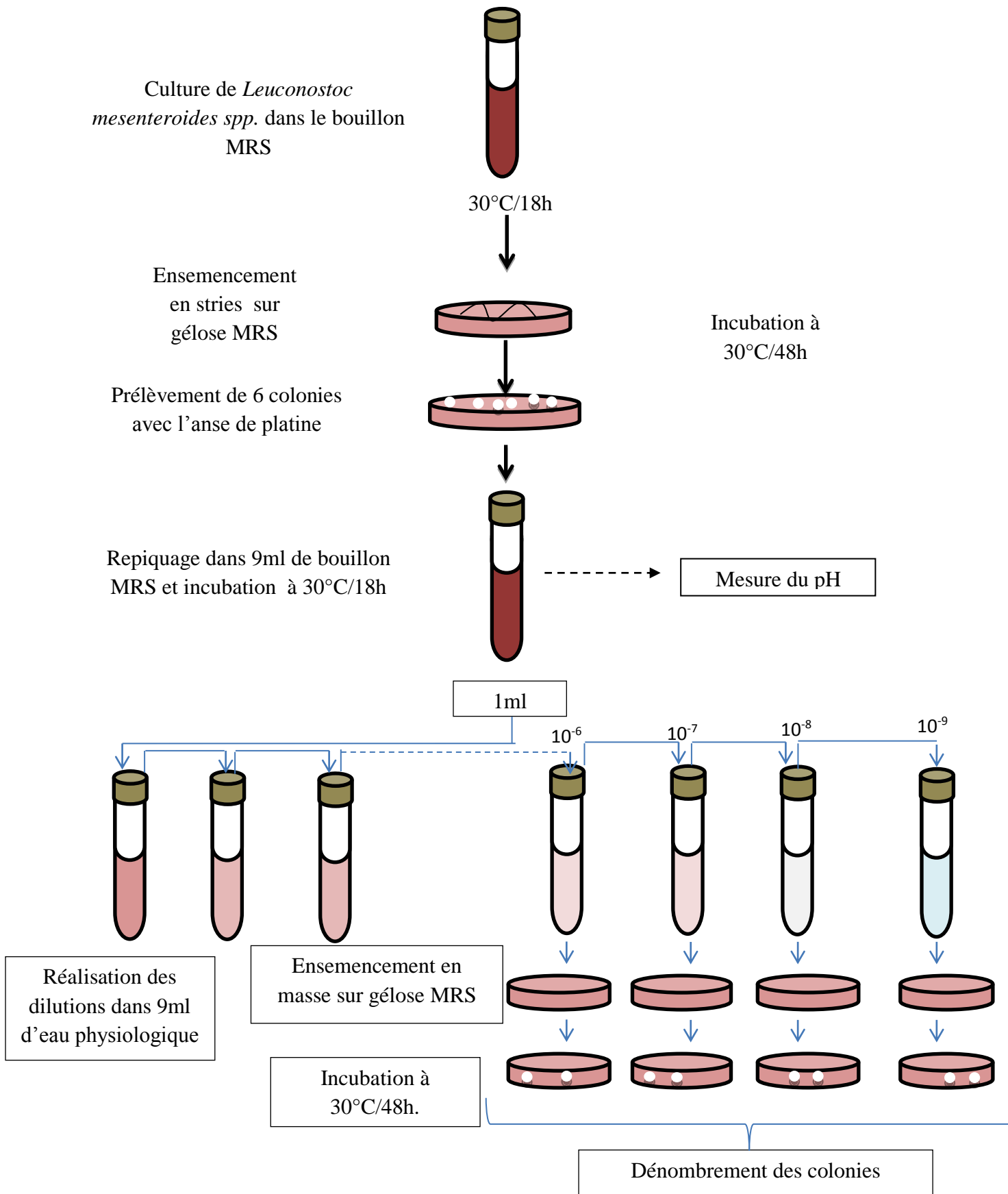


Figure 3 : Schémas de standardisation des *inocula* des souches tests.

2.2. Préparation des *inocula* standards des souches cibles

Les souches pathogènes sont repiquées dans 9ml de BN et incubées à 37°C (à 30°C pour *Pseudomonas 1*) pendant 18h (figure 4).

Après 18 heures d'incubation, un ensemencement en surface est réalisé sur le même milieu gélosé puis incubé à 37°C (à 30°C pour *Pseudomonas 1*) pendant 24h.

Au terme de cette dernière, une colonie bien isolée et bien distincte a été repiquée à chaque fois dans un tube à essai de 9 ml de bouillon nutritif, puis incubées à 37°C (à 30°C pour *Pseudomonas 1*) pendant 18h.

Au terme de la période d'incubation, une série de dilution décimales allant jusqu'à 10^{-9} est effectuée, 1ml des 4 dernières dilutions sont ensemencées en masse dans une GN à raison de 2 boîtes par dilution. Après incubation à 37°C (à 30°C pour *Pseudomonas*) pendant 24h on procède au dénombrement des colonies en utilisant un compteur de colonie (suntex colony counter 570).

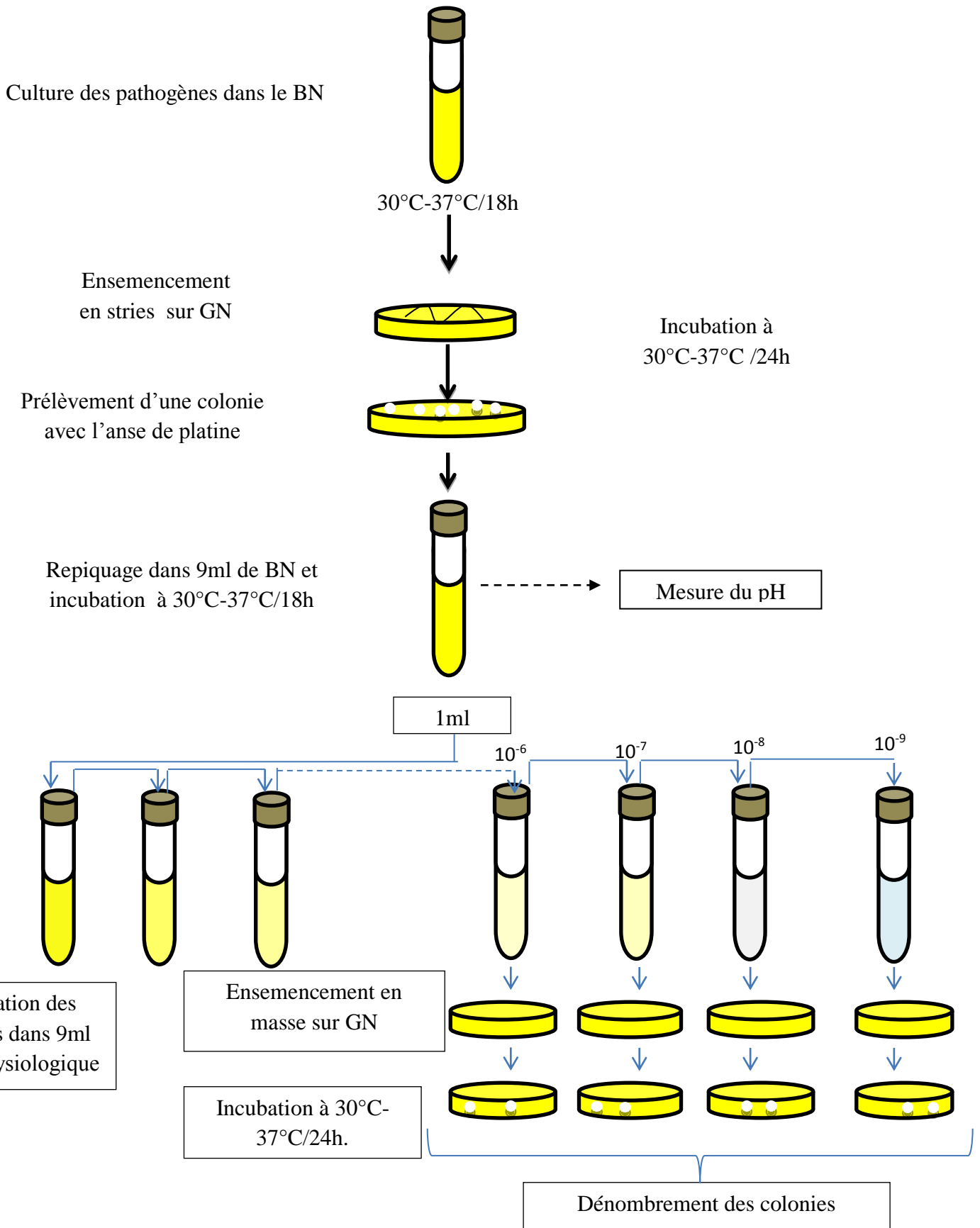


Figure 4: Schémas de standardisation des *inocula* des souches cibles.

3. Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches pathogènes vis-à-vis des antibiotiques est déterminée par la méthode de l'antibiogramme par diffusion sur gélose nutritive dans le but de déterminer le profil de résistances de ces souches pathogènes et la sensibilité des souches de *Leuconostoc mesenteroides* vis-à-vis des antibiotiques est déterminée par la méthode de l'antibiogramme par diffusion sur gélose MRS dans le but de l'éventuelle utilisation de ces souches comme probiotique vis-à-vis des pathogènes qui présenterais la même résistance au cours d'une antibiothérapie.

Les boîtes de pétries sont coulées avec la gélose MRS ou gélose nutritive, après un séchage de 15 min à température ambiante, les boîtes sontensemencées en surface par écouvillonnage avec la culture fraîche de 18 h des souches de *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* (LnAL3) et *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* (Ln37) et des souches pathogènes à une concentration de 10^8 UFC/ml et de 10^7 UFC/ml respectivement (à l'exception des levures et des champignons) dans leur milieu respective, de façon à réaliser des stries serrés. On répète l'opération 3 fois de suite tout en tournant la boîte de 60° on faisons pivoter l'écouvillon sur lui-même, et pour finir on passe l'écouvillon sur la périphérie de la boîte.

On dépose les disques d'antibiotiques à tester à l'aide d'une pince stérile (Tableau IV). Les boîtes de pétries sont pré-incubées pendant 2 heures à 4°C et puis incubées 24 h à 30°C pour les souches LnAL3 et Ln37 et à 37°C pour les souches pathogènes.

Au terme de l'incubation, les résistances et les zones d'inhibition sont noté, puis comparées au tableau des normes des recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2013).

Tableau IV : liste des antibiotiques utilisés

Nom	Abréviation	Charge (μg)	Famille
Oxacilline	OX	5	Bêtalactamines
Cefoxitine	FOX	30	Bêtalactamines
Spiramycine	Sp	100	Macrolides
Ampicilline	A	10	Bêtalactamines
Vancomycine	VA	30	Glycopeptides
Cephalixine	Cp	30	Bêtalactamines

4. Recherche *in vitro* de l'activité antimicrobienne des souches de *Leuconostoc mesenteroides* à l'égard de souches cibles sur milieu solide

Pour la mise en évidence de l'éventuelle production de substances antimicrobienne par les souches de *Leuconostoc mesenteroides* (Ln25, Ln37 et LnAL3) vis-à-vis des souches cibles, la méthode de diffusion en gélose est utilisée. Cette méthode est basée sur le principe que des substances inhibitrices peuvent diffuser dans un milieu de culture solide et interférer avec la croissance d'une souche cible préalablement inoculée dans le milieu; l'action de ces substances se manifeste alors par l'apparition de zones d'inhibition. Dans cette étude deux méthodes sont utilisées : méthode des spots et méthode des puits.

4.1 Méthode des spots

L'activité antimicrobienne de *Ln. mesenteroides* à l'égard d'*E.coli*, *S.aureus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* et *Botrytis cinerea* est mise en évidence par un test d'antagonisme direct qui est le test des spots.

Après avoir coulé les boîtes de Pétri avec la gélose MRS (solidifiée et séchée), 5µl de la suspension bactérienne de la souche *Ln. mesenteroides* (Ln25, LnAL3, Ln37) obtenue après 18 h d'incubation à 30°C sont déposés en spots. Les boîtes sont séchées près du bec Bensen pendant 30 min puis incubées à 30°C pendant 18-20h (figure 5).

Après la période d'incubation, la gélose MRS est recouverte de 9 ml d'une gélose nutritive en surfusion ensemencée avec 1 ml d'une culture fraîche de 18 h de la souche pathogène (d'une concentration de 10^7 UFC/ml), puis ré-incubée à 37°C (à 30°C pour la souche de *Pseudomonas I*, *Aspergillus flavus* et *Botrytis cinerea*) pendant 18-20h.

Au terme de la période d'incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré (Jacobsen et al., 1999 ; Makhoulfi, 2012).

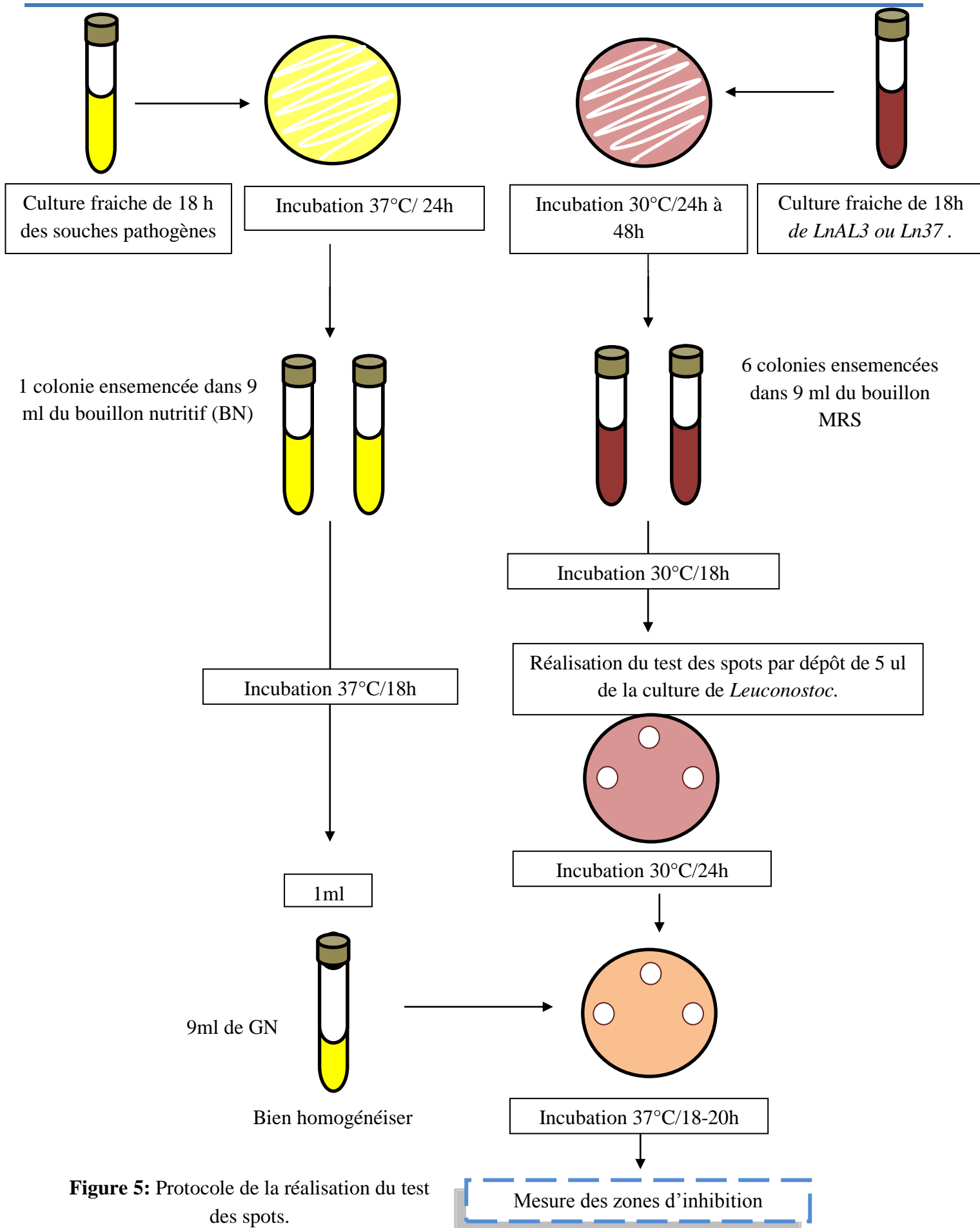


Figure 5: Protocole de la réalisation du test des spots.

La méthode des puits est une méthode indirecte qui permet de mettre en contact le surnageant de culture de la souche productrice de substances antibactériennes avec la souche cible.

Les souches de *Leuconostoc mesenteroides* (LnAL3 et Ln37) sont cultivées dans du bouillon MRS et incubées pendant 18 h à 30°C. Après incubation, la culture est centrifugée à 8000g pendant 20 min à 4°C (Centrifugeuse Rotina 380R, Hettich Zentrifugeu, Allemagne). Les surnageants sont récupérés, aseptiquement, dans des tubes stériles, après mesure du pH, ils sont testés pour leur activité envers les souches cibles. Puis re-tester après concentration de 4 fois puis de 10 fois (Lyophilisateur christ LOC, 1m).

Des boîtes de Pétrie sont coulées avec 20ml de gélose nutritive, chaque uneensemencée en masse avec 1ml d'une culture de 18h de pathogènes ramenée à 10^7 germes/ml par des dilutions dans du bouillon nutritif.

Après solidification, des puits de 6 mm de diamètre et de 5 mm de profondeur sont creusés dans la gélose à l'aide d'une pipette Pasteur stérile puis scellés avec 5µl de la gélose correspondante.

Après séchage des boîtes (30min à la température ambiante), les puits sont remplis de 100µl de chaque type de surnageant de la culture bactérienne test.

Un puits témoin est rempli avec du bouillon MRS.

Ces boîtes de pétri sont entreposées pendant 2 h à 4°C, pour arrêter la croissance du germe cible et pour permettre la diffusion des substances antimicrobienne contenus, éventuellement, dans les surnageant, puis incubées pendant 18 à 20 h à 37°C (à 30°C pour la souche de *Pseudomonas1*, *Aspergillus flavus* et *Botrytis cinerea*). L'apparition d'une zone claire d'inhibition de la souche cible autour des puits est considéré, comme résultat positif (Ennahar et al., 1998; Ammor et al., 2006 ;Morisset,2011) .

Au terme de cette étude le surnageant concentré 10 fois est retenu pour le reste de l'étude.

5. Recherche de l'origine de l'activité antimicrobienne

5.1 Test d'acidité

Afin de déterminer la nature des métabolites à l'origine de l'activité antimicrobienne l'effet du pH est testé par la neutralisation du surnageant concentré 10 fois de chaque souche de *Leuconostoc mesenteroides* à pH 6,5 et 7 selon la méthode des puits cité précédemment.

Des puits témoin sont réalisés, certains sont remplis avec du bouillon MRS et d'autres avec l'acide lactique à 30%.

Après incubation, l'apparition d'une zone claire d'inhibition de la souche cible autour des puits est considérée comme résultat positif (Kim et Chun, 2005).

5.2 Test des protéases

Afin de déterminer la nature protéique des métabolites à l'origine de l'activité antimicrobienne le test des protéases est réalisé avec le surnageant concentré 10 fois de chaque souche de *Leuconostoc mesenteroides*.

Pour cela deux solutions tampons sont préparées : tampon phosphate et tampon Citrate-phosphate (Tableau XV, Annexe III).

Pour la préparation des solutions enzymatiques, une concentration de 3 mg/ml d'enzyme est ajoutée aux solutions tampons adéquates :

- La pepsine dans le tampon Citrate-phosphate pH 3
- La trypsine dans le tampon phosphate de sodium pH 7

En suite un volume de 2ml de la solution enzymatique est additionné stérilement à 2ml de chaque type de surnageant concentré 10 fois (LnAL3 et Ln37).

La solution (surnageant concentré 10 fois /protéase) est incubée pendant 2 heures à 37°C.

Au terme de l'incubation, deux chauffages sont réalisés parallèlement un pendant 5 min à 100 °C et le deuxième 5 min à 80 °C.

Des boîtes de pétrie sont coulées avec 20ml de gélose nutritive etensemencées en masse respectivement avec 1ml d'une culture de 18h de *E.coli* 2 et *S.aureus* 2 ramenée à environ 10^7 germes /ml par des dilutions dans du BN.

Après solidification, des puits de 6 mm de diamètre et de 5 mm de profondeur sont creusés dans la gélose à l'aide d'une pipette Pasteur stérile puis scellés avec une goutte de gélose correspondante.

Après séchage des boîtes (30min à la température ambiante), les puits sont remplis de 100µl de chaque type de solutions préparées (surnageant concentré 10 fois /protéase).

Un puits témoins est réalisé pour ce test, rempli avec du bouillon MRS stérile.

Le témoin a été réalisé vis-à-vis de la souche *S.aureus 2*.

La diffusion des surnageants dans la gélose est obtenue après entreposage des boîtes pendant 2 h à 4°C.

Les boîtes sont ensuite incubées pendant 18 à 20h à 37°C. Au terme de l'incubation le diamètre des zones d'inhibition autour des puits est mesuré (Atanassova et al., 2003).

4.1 Test de thermorésistance

En vue de déterminer la thermorésistance éventuelle des métabolites de nature protéique à l'origine de l'activité antimicrobienne, le surnageant concentré 10 fois de chaque souche de *Leuconostoc mesenteroides* subit différent traitement thermique l'un à 80°C et 100°C, selon la méthode des puits cité précédemment.

Pour cela les puits sont remplis comme suit :

- Le premiers puits est rempli avec le surnageant LnAL3 concentré 10 fois chauffé à 100°C pendant 5 min ;
- Le deuxième puits témoin est rempli avec le surnageant Ln37 concentré 10 fois chauffé à 100°C pendant 5 min ;
- Le troisième puits témoin est rempli avec le surnageant Ln37 concentré 10 fois chauffé à 80°C pendant 5 min.

Le test a été réalisé vis-à-vis de la souche *S.aureus 2*.

La diffusion des surnageants dans la gélose est obtenue après entreposage des boîtes pendant 2 h à 4°C.

Les boîtes sont ensuite incubées pendant 18 à 20h à 37°C. Au terme de l'incubation le diamètre des zones d'inhibition autour des puits est mesuré (Kim M et Chun J., 2005).

1. Résultats de la vérification de la pureté des souches

Les résultats obtenus pour la vérification de la pureté des souches utilisées sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau V : Caractéristiques des souches utilisées.

Souches utilisées	Aspect sur gélose	Gram	Catalase
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>subsp. cremoris</i> (Ln25)	Sur gélose MRS les colonies sont petites rondes blanches et lenticulaire.	+	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>subsp. mesenteroides</i> (LnAL3)			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>subsp. mesenteroides</i> (Ln37)			
<i>S. aureus</i> 1	Sur gélose nutritive on observe des colonies arrondies, humides, opaques, luisantes et crémeuses à surface lisse et à bord régulier ; Sur gélose Chapman on constate le virage de couleur du rouge au jaune.	.+ Cocci arrondi, regroupement en grappe de raisin.	+
<i>S. aureus</i> 2			
<i>E. coli</i> 1	Sur gélose nutritive les colonies sont arrondies, humides, brillantes, lisses et de couleur blanchâtre légèrement jaunâtre. Sur gélose E.M.B les colonies sont d'un violet foncé avec un éclat métallique verdâtre caractéristique.	-	+
<i>E. coli</i> 2			
<i>Enterobacter sp.</i> 1	Sur gélose nutritive les colonies sont lisses et brillantes, Indol -, Bouillon BCPL virage de couleur vers le jaune avec production de gaz.	-	+
<i>Enterobacter sp.</i> 2			
<i>Salmonella enterica subsp.</i> <i>arizonae</i>	Sur gélose nutritive les colonies observées sont lisses, translucides, légèrement surélevées et d'un diamètre de 2 mm environ.	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sur gélose nutritive les colonies sont arrondies, opaques, lisses avec coloration bleu verdâtre de la gélose.	-	-
<i>Candida albicans</i>	Sur gélose sabouraud les colonies sont blanches crémeuses et lisses.		
<i>Aspergillus flavus</i>	Sur gélose sabouraud les colonies sont duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaunes, puis vert-jaunes au bout de 2 à 3 jours.		
<i>Botrytis cinerea</i>	Sur gélose sabouraud les colonies ont un aspect floconneux, duveteux à poudreux, d'abord blanches, puis jaunes, puis vert-jaunes au bout de 2 à 3 jours.		

Les résultats obtenus (figure 6) pour les tests réalisés confirment la pureté des souches utilisées dans cette étude.

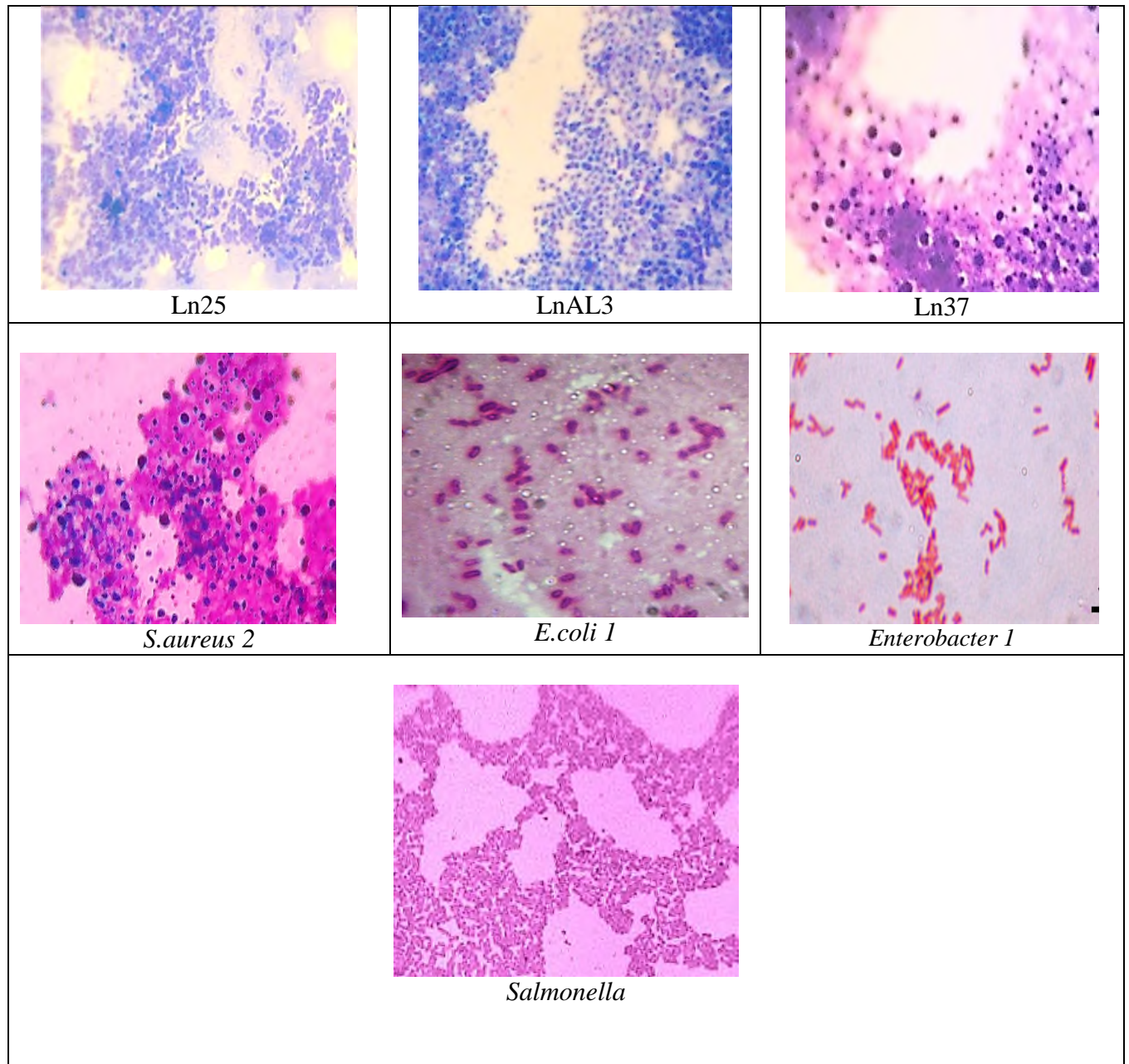


Figure 6 : Résultats de la coloration de Gram (grossissement $\times 100$).

Les caractères culturels observés sur les milieux de culture appropriés montrent que les souches étudiées correspondent aux propriétés de ces dernières (figure 7).

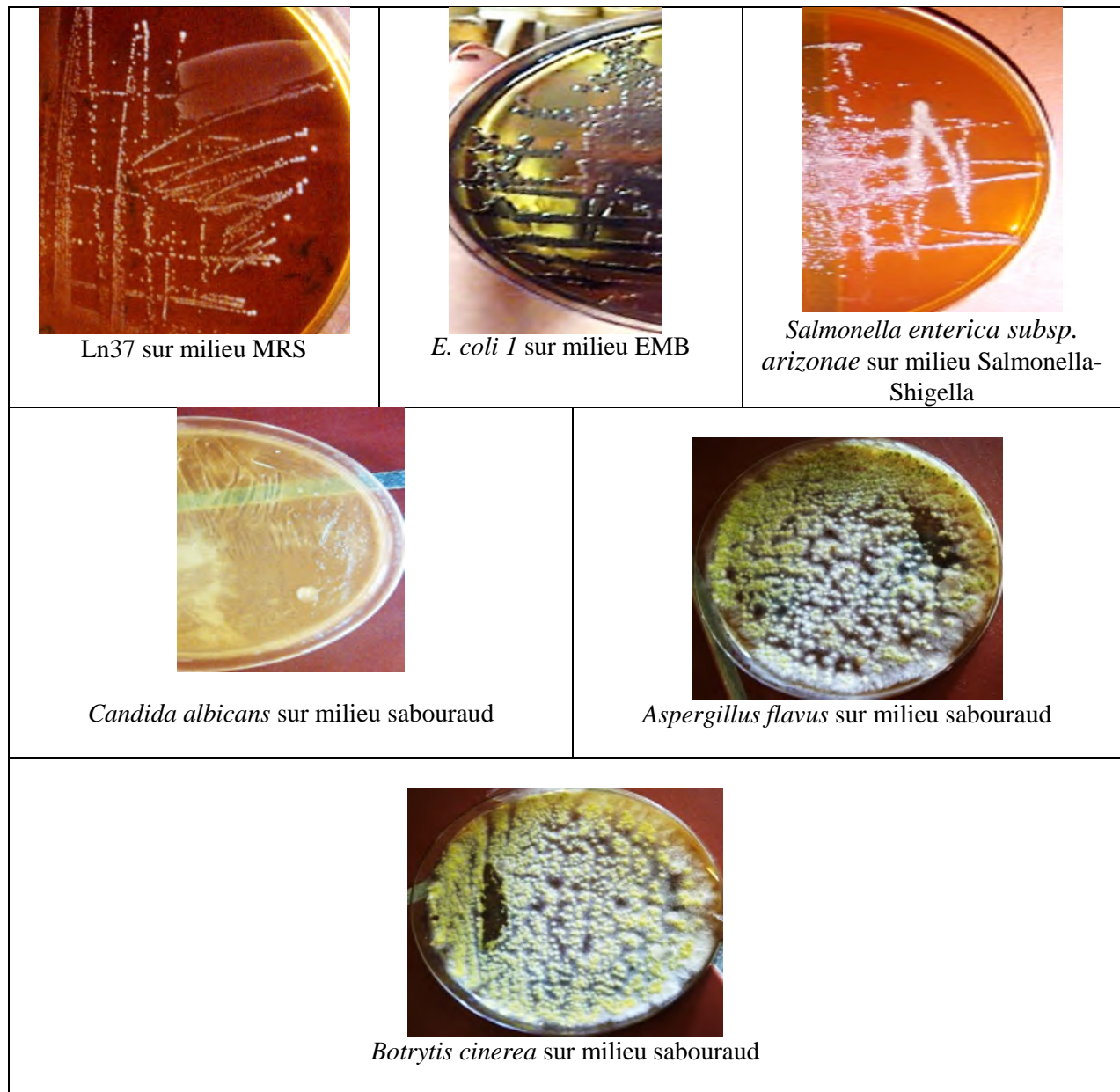


Figure 7 : Caractères culturels de quelques souches étudiées

2. Standardisation des inocula

Les résultats de la standardisation des souches de *Leuconostoc mesenteroides*. montrent qu'à partir de 6 colonies, incubées à 30°C/18h, donne un inoculum au alentour de 10⁹ germes /ml (tableau VI).

Tableau VI : Résultats de la standardisation des *inocula* des souches tests.

Souche test	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris (Ln25)</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides (LnAL3)</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides (Ln37)</i>
UFC/ml	5.10 ⁹	16,6.10 ⁹	8,6. 10 ⁹

Les résultats de la standardisation des souches pathogènes montre qu'à partir d'une colonie incubées à 37°C/18h, des taux assez élevés sont obtenus (tableau VII) pour toutes les souches.

Tableau VII : Résultats de la standardisation des *inocula* des souches cibles

Souche test	<i>S.aureus 1</i>	<i>E.coli 1</i>	<i>Enterobacter 2</i>	<i>Salmonella enterica subsp. arizonae</i>	<i>Pseudomonas A</i>
UFC /ml	9,5.10 ⁸	28. 10 ⁸	6. 10 ⁸	2,3. 10 ⁸	14,3. 10 ⁸

3. Résultats de l'étude de la sensibilité des souches de *Leuconostoc mesenteroides* et des pathogènes vis-à-vis des antibiotiques

Les résultats de l'étude de la sensibilité des souches de *Leuconostoc mesenteroides* vis-à-vis des antibiotiques testés (tableau VIII), montrent que les souches LnAL3 et Ln37 sont résistantes vis-à-vis de tous les antibiotiques testés, effectivement le genre *Leuconostoc* est connu pour sa résistance à la vancomycine (Holzapfel et al., 2009).

Tableau VIII : Résultats de l'étude de la sensibilité des souches de *Leuconostoc mesenteroides* vis-à-vis des antibiotiques.

ATB. Souches	1 : OX(5)	2: FOX(30)	3 : Sp	4 : A (10)	5 : VA	6 : Cp
Ln AL3	12 (R)	Absence (R)	15 mm (R)	Absence (R)	Absence (R)	Absence (R)
Ln 37	10 (R)	Absence (R)	14 mm (R)	Absence (R)	Absence (R)	Absence (R)

S : sensible, R : résistant

Les résultats de l'étude de la sensibilité des souches pathogènes vis-à-vis des antibiotiques testés (tableau IX), montrent que les souches *S. aureus 1*, *E.coli 1*, *Enterobacter 1*, *Salmonella enterica subsp. arizonae* et *Pseudomonas 1* sont résistantes vis-à-vis de tout les antibiotiques testés. Néanmoins les souches *S. aureus 1* et *Salmonella enterica subsp. arizonae* présentent une sensibilité vis-à-vis de l'oxacilline, tandis qu'*E.coli 1* et *Enterobacter 1* montre une sensibilité intermédiaire et que la souche de *Pseudomonas 1* est résistante à ce dernier antibiotique.

Les phénomènes de résistance bactériennes aux antibiotiques augmentent régulièrement que ce soit en milieu communautaire ou hospitalier, et constituent un véritable problème de santé publique pour lequel la communauté scientifique et médicale internationale se mobilise (Stahl, 2006), en effet la résistance des souches de *Leuconostoc mesenteroides* aux antibiotiques testés pourrait donc présenter un avantage pour remédier à ces problèmes de résistance dans le cas de leur utilisations comme probiotique vis-à-vis des pathogènes qui présenterais la même résistance au cours d'une antibiothérapie. Des études ont montrées que l'ingestion de lait fermenté contenant 10^8 g^{-1} de *Lc. lactis* et de *Ln. mesenteroides* réduit la durée de la diarrhée moyenne de 0,3 jours chez les enfants (Agarwal & Bhasin, 2002 ; Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

Tableau IX : Résultats de l'étude de la sensibilité des souches pathogènes vis-à-vis des antibiotiques.

ATB. Souches	1 : OX(5) (mm)	2 : A (10) (mm)	3 : FOX(30) (mm)
<i>S. aureus 1</i>	27 (S)	11 (R)	10 (R)
<i>E.coli 1</i>	26(I)	8 (R)	8 (R)
<i>Enterobacter 1</i>	26(I)	11 (R)	Absence (R)
<i>Salmonella enterica subsp. arizonae</i>	28(S)	Absence (R)	Absence (R)
<i>Pseudomonas 1</i>	22(R)	Absence (R)	10 (R)

S : sensible, R : résistant, I: intermédiaire

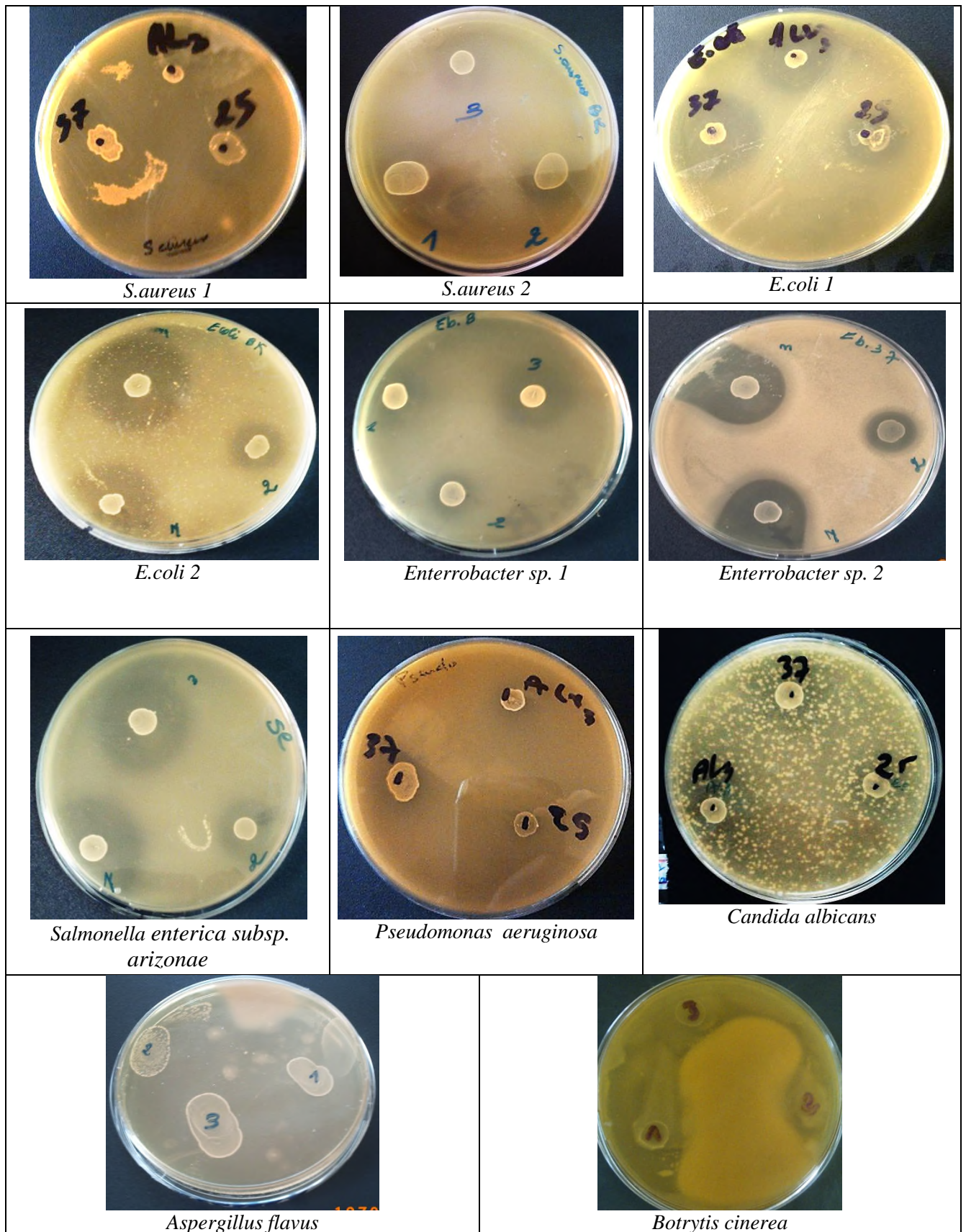
4. Recherche *in vitro* de l'activité antimicrobienne des souches de *Leuconostoc mesenteroides* à l'égard des souches cibles sur milieu solide

4.1 Test des spots

Les résultats des tests d'antagonismes directs par la méthode des spots pour les souches Ln25, LnAL3, Ln37 présentent toutes une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches cibles sauf à l'égard de *Candida albicans* (figure 8).

Les zones d'inhibition révélées sont claires avec des bordures bien distinctes. La plus faible activité est enregistrée pour la souche Ln25 avec une zone d'inhibition de 12,5mm vis-à-vis de la souche de *Pseudomonas I*. La plus grande activité est révélée par la souche Ln 37 avec un diamètre de 50mm vis-à-vis de la souche *S.aureus I*.

Les résultats obtenus indiquent que les 3 souches de *Leuconostoc mesenteroides ssp.* sont capables de synthétiser des substances antimicrobiennes envers les souches cibles.



1 : Souches Ln37 ; 2 : Souches Ln25 ; 3 : Souches LnAL3 ; 37 : Souches Ln37 ; 25 : Souches Ln25 ; AL3 : Souches LnAL3.

Figure 8 : Résultats du test des spots.

En comparant l'activité antagoniste de ses 3 souches de *Leuconostoc mesenteroides*, on constate qu'elles présentent la même activité inhibitrice vis-à-vis d'*Aspergillus flavus* avec des zones d'inhibitions supérieures à 50mm de diamètre, et montre que la souche de Ln25 présente les plus faibles zones d'inhibitions vis-à-vis de toutes les souches cibles, les résultats sont illustrés dans la figure 9.

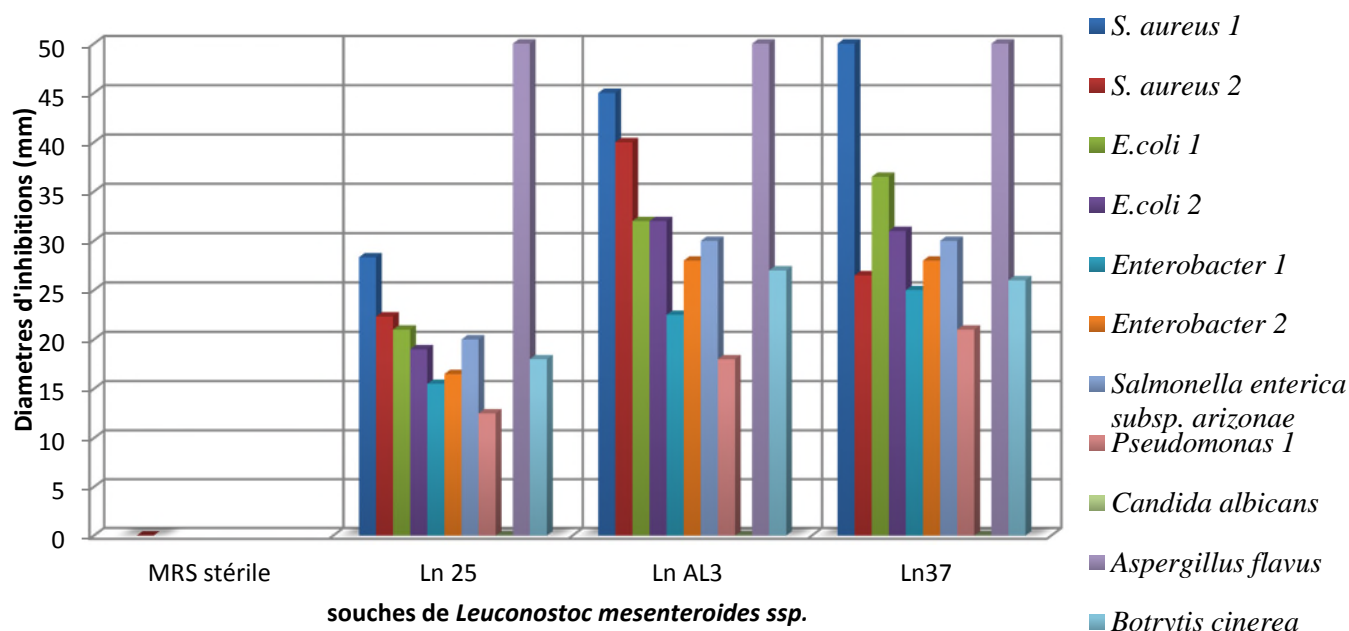


Figure 9 : Résultats de l'activité antimicrobienne des 3 souches de *Leuconostoc mesenteroides ssp.* (Test des spots).

Les souches de *Leuconostoc* LnAL3 et Ln37 présentent les mêmes zones d'inhibitions vis-à-vis d'*Enterobacter 2* et de *Salmonella* qui sont respectivement de 28mm et de 30mm de diamètre. Ces mêmes souches montrent des zones d'inhibitions variables vis-à-vis des autres souches cibles.

La souche LnAL3 présente une plus grande activité antimicrobienne vis-à-vis de *S.aureus 2*, d'*E.coli 2* avec respectivement 40mm et 32,5mm de diamètre, par rapport à la souche Ln37 avec respectivement 26,5mm et 31mm de diamètre.

Cependant, une plus grande activité antimicrobienne vis-à-vis de *S.aureus 1*, d'*E.coli 1*, d'*Enterobacter 1*, de *Pseudomonas 1* et de *Botrytis cinerea*, avec respectivement 50mm ; 36,5mm ; 25mm ,21mm et 27mm de diamètre est notée pour la souche Ln37 par rapport à la souche LnAL3 avec respectivement 45mm, 32mm, 22,5mm ; 18mm et 26mm de diamètre.

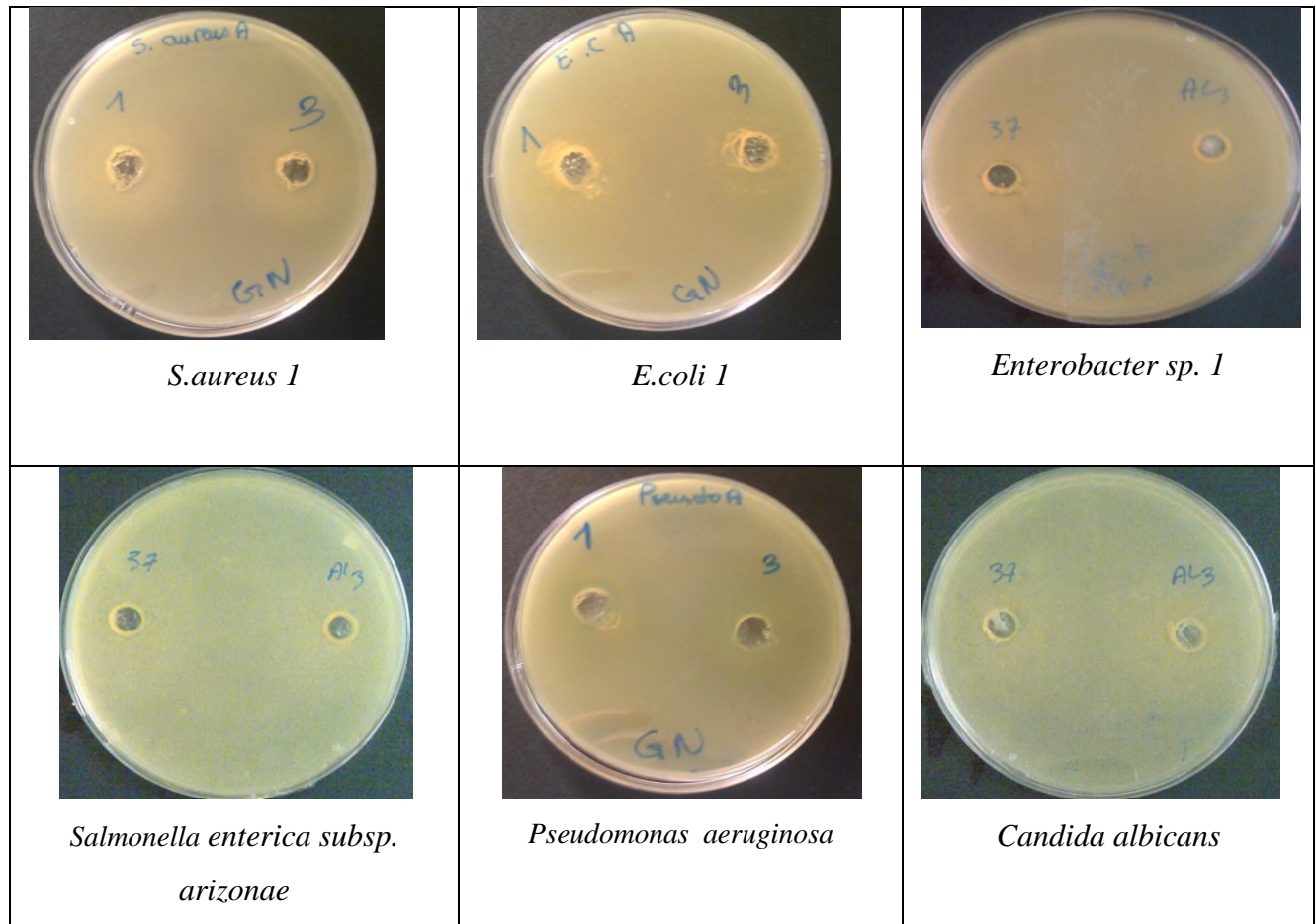
Les résultats obtenus montrent non seulement une très bonne activité antibactérienne des souches de *Leuconostoc mesenteroides* mais également une activité antifongique assez intéressante surtout dans la lutte biologique (antifongique). Cette activité antimicrobienne peut s'expliquer par la production d'un ou de plusieurs métabolites antimicrobiens vu que le bouillon MRS seul n'a montré aucune zone d'inhibition.

Effectivement, le mécanisme par lequel *Leuconostoc* inhibe la croissance microbienne des bactéries lactiques ainsi que la flore d'altération et/ou pathogènes a été attribué à des produits de dégradation des glucides et au métabolisme du citrate (Dessart et Steenson, 1995; Caplice et Fitzgerald, 1999). L'effet antimicrobien des acides organiques, y compris l'acide lactique et le acide acétique, affectent les propriétés des membranes telles que le potentiel de la membrane et de l'intégrité de la cellule (Alakomi et al., 2000; Caboet al., 2002). Les propriétés antibactériennes de l'éthanol et du diacétyl sont également décrit, bien que leurs effets soient faibles dans les fermentations lactiques habituelles. En présence d'oxygène, *Leuconostoc* accumule du peroxyde d'hydrogène qui pourrait être inhibiteur de certains micro-organismes (Condon, 1987).

En effet, en général les bactéries lactiques peuvent inhiber la prolifération de la flore indésirable qu'elle soit pathogène ou d'altération, par la production de divers composés bactéricides ; le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et des substances de nature protéique telles que les bactériocines, des acides organiques tel que l'acide lactique et l'acide acétique entraînant l'acidification du milieu et donc la réduction du pH (Hécharde et al., 1993 ; Doumandji et al., 2010) .

4.2 Test des puits

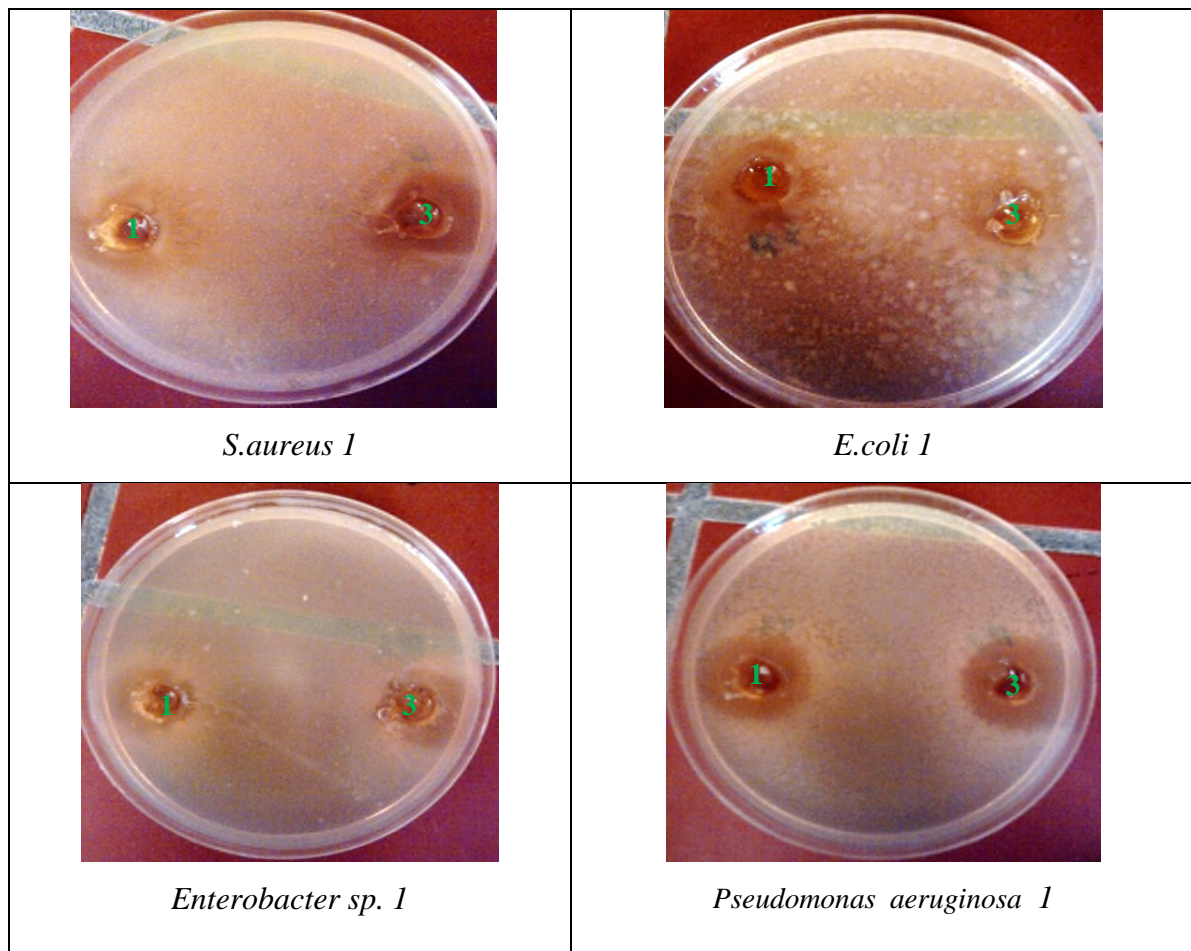
Après 18h d'incubation, les résultats obtenus (figure 10) avec les surnageants de la culture des deux souches de LnAL3 et Ln37 à pH natif (4,80 et 4.37 respectivement) n'ont montrés aucune zone d'inhibition lors de ces tests d'antagonismes sauf vis-à-vis de *Pseudomonas 1* avec respectivement des zones d'inhibitions de 21mm et de 20mm de diamètre.



1 : Ln37, 3 : LnAL3

Figure 10: Résultats du test des puits des surnageants natifs.

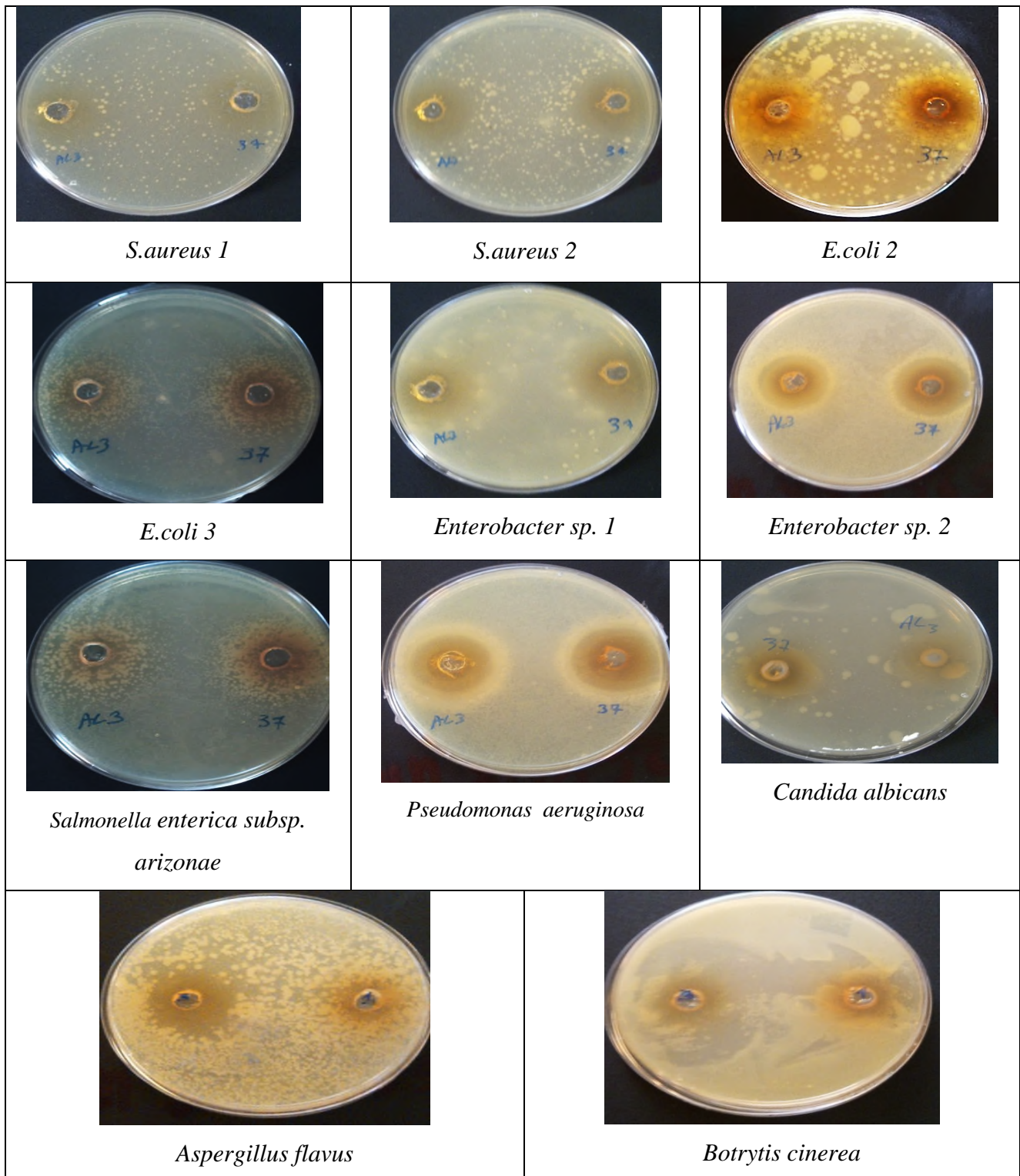
L'absence des zones d'inhibitions des surnageants natifs peut s'expliquer par la faible concentration dans les surnageants des substances antimicrobiennes probablement synthétisées par les souches de *Leuconostoc mesenteroides*. En effet, les surnageants de la culture des mêmes souches ont été concentrés 4 fois, les résultats obtenus (figure 11) après concentration des surnageants montrent effectivement l'apparition de zones d'inhibitions claires autour des puits, ce qui confirme la présence d'une ou plusieurs substances antimicrobiennes dans ces surnageants.



1 : Ln37, 3 : LnAL3

Figure 11 : Résultats du test des puits des surnageants concentrés 4 fois.

Pour une meilleure observation de l'effet inhibiteur, les mêmes surnageants ont été concentrés 10 fois, les résultats obtenus (figure 12) après concentration des surnageants montrent une meilleure activité antimicrobienne sur la croissance des souches cibles et ceci se manifeste par la formation de zones plus importantes autour des puits indiquant l'absence de la croissance des souches cibles autour de la zone.



Souches Ln37 ; 2 : Souches Ln25 ; 3 : Souches LnAL3 ; 37 : Souches Ln37 ; 25 : Souches Ln25 ; AL3 : Souches LnAL3.

Figure 12: Résultats du test des puits des surnageants concentrés 10 fois.

En comparant l'activité antagoniste des surnageants concentrés 4 fois des deux cultures des souches LnAL3 et Ln37 (Figure 13), on constate que, ces surnageants présentent les mêmes zones d'inhibitions vis-à-vis d'*E.coli 1*. qui est de 25mm de diamètre. Cependant, des zones d'inhibitions variables sont notées vis-à-vis des autres souches cibles.

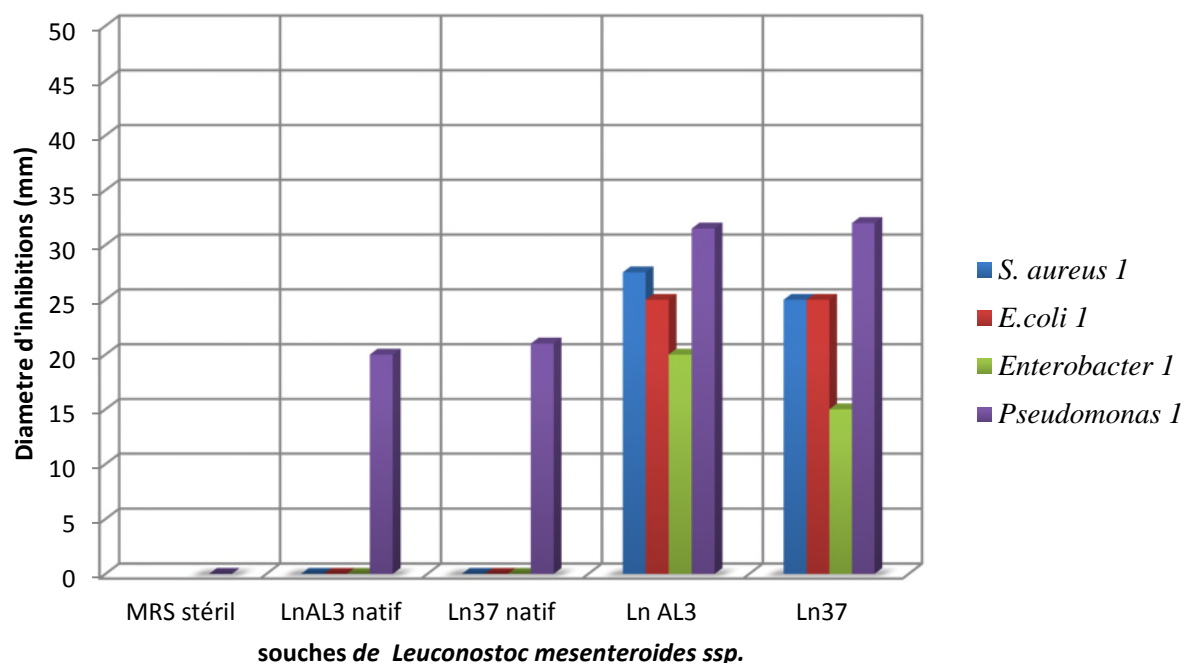


Figure 13 : Résultats de l'activité antimicrobienne des surnageants concentrés 4 fois de la culture des souches LnAL3 et Ln37 (test des puits).

La souche LnAL3 présente une plus grande activité antimicrobienne vis-à-vis de *S.aureus 1*, d'*Enterrobacter 1* et de *Pseudomonas 1* avec respectivement 27,5mm ; 20mm et 28 mm de diamètre, par apport à la souche Ln37 avec respectivement 25mm ; 15mm et 20mm de diamètre.

Tous les résultats obtenus avec les surnageants concentrés 4 fois de la culture des souches LnAL3 et Ln37 montre une bonne activité antimicrobienne. Cependant, une meilleure activité antimicrobienne est obtenue après concentration 10 fois des surnageants.

En comparant l'activité antagoniste des surnageants concentrés 10 fois de la culture des souches LnAL3 et Ln37 (Figure 14), on constate que, ces deux dernières présentent approximativement ou les mêmes zones d'inhibitions vis-à-vis d'*E.coli 2*, d'*Enterrobacter 1* et

de *Pseudomonas 1* avec respectivement des zones d'inhibition de 19,5mm 28,5mm, et de 31,5 mm de diamètre.

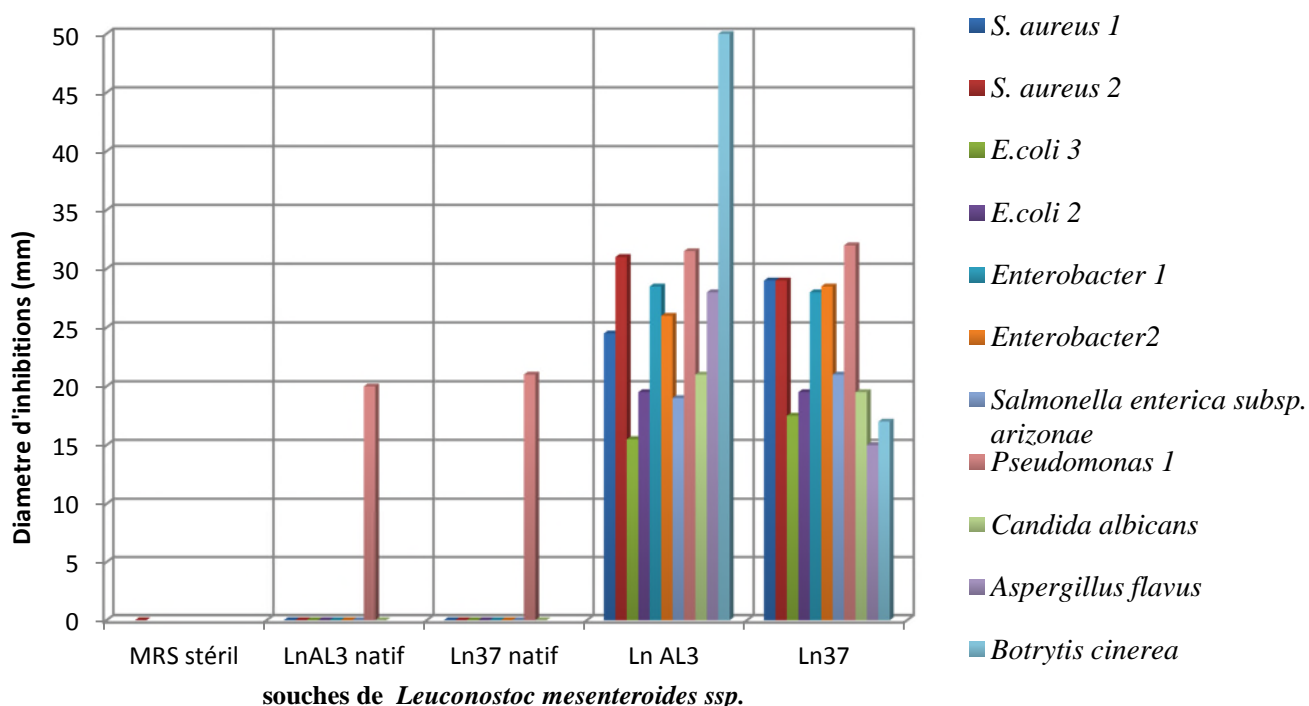


Figure 14 : Résultats de l'activité antimicrobienne des surnageants concentrés 10 fois de la culture des souches LnAL3 et Ln37 (test des puits).

La souche LnAL3 présente une plus grande activité antimicrobienne vis-à-vis de *S.aureus 2*, *Candida albicans*, d'*Aspergillus flavus* et de *Botrytis cinerea* avec respectivement des zones d'inhibition de 31mm ; ,21mm, 28mm et 50mm de diamètre, par apport à la souche Ln37 avec respectivement 29m, 19,5mm, 15mm et 17mm de diamètre.

La souche Ln37 présente une plus grande activité antimicrobienne vis-à-vis de *S.aureus 1*, d'*E.coli 3*, d'*Enterrobacter 2*, et de *Salmonella ssp.* avec respectivement des zones d'inhibitions de 29mm ; 17,5mm ; 28,5mm ; et 21mm de diamètre, par apport à la souche LnAL3 avec respectivement 24,5mm ; 15,5mm ; et 19mm.

Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus avec les surnageants concentrés 10 fois témoignent d'une activité antimicrobienne importante des souches de *Leuconostoc mesenteroides ssp.* pour cette raison, ce dernier est sélectionné pour le reste de l'étude.

Plusieurs études confirment ces résultats obtenus ; Genske et Brenen, 1973 ont montré que les leuconostocs, principalement *Ln. cremoris*, en association avec des bactéries lactiques mésophiles sont capables d'inhiber la croissance de microorganismes pathogènes tel que *S. aureus* ou de bactéries psychrotrophes (Juffs et Babel, 1975). Les filtrats de culture sur bouillon MRS de 7 souches de *Leuconostoc* producteurs de dextrans sur 35 essayées inhibaient la croissance de la souche de *Pseudomonas fluorescens*.

Mather et Babel (1959) ont montré qu'un mélange composé d'une part et demie de crème à 20 % et d'une part d'une culture acidifiée de *Ln. cremoris* à du «cottage cheese» inoculé avec *Pseudomonas fragi* et *Pseudomonas putrefaciens*, empêchait ou/au moins retardait l'aspect visqueux et la protéolyse provoqué par ces *Pseudomonas*. Les bactéries coliformes étaient également inhibées sauf pour *Geotrichum candidum* et *Candida pseudotropicalis*. Marth (1962) et Marth et Hussong (1963) ont montré que des filtrats de culture sur lait écrémé de *Ln. citrovorum* (*Ln. cremoris*) inhibaient des souches d'*Aerobacter aerogenes*, d'*Escherichia coli*, de *Pseudomonas fluorescens* et de *Pseudomonas fragi* et que l'inhibition dépendait à la fois des souches de *Ln. citrovorum* (*Ln. cremoris*) cultivées et des souches des microorganismes testés.

Sorrells et Speck (1970) ont montré que des filtrats de culture de *Ln. citrovorum* inhibaient la croissance de *Salmonella gallinarum* à un degré moindre celle de *Salmonella typhimurium* et celle de *Staphylococcus aureus*.

Le mécanisme d'inhibition microbienne par *Ln. cremoris* n'est pas encore clairement élucidé. Pour certains (Sorrells et Speck ,1970 ; Daly et al., 1972) cette action inhibitrice serait due à la présence d'acides organiques et principalement de l'acide acétique.

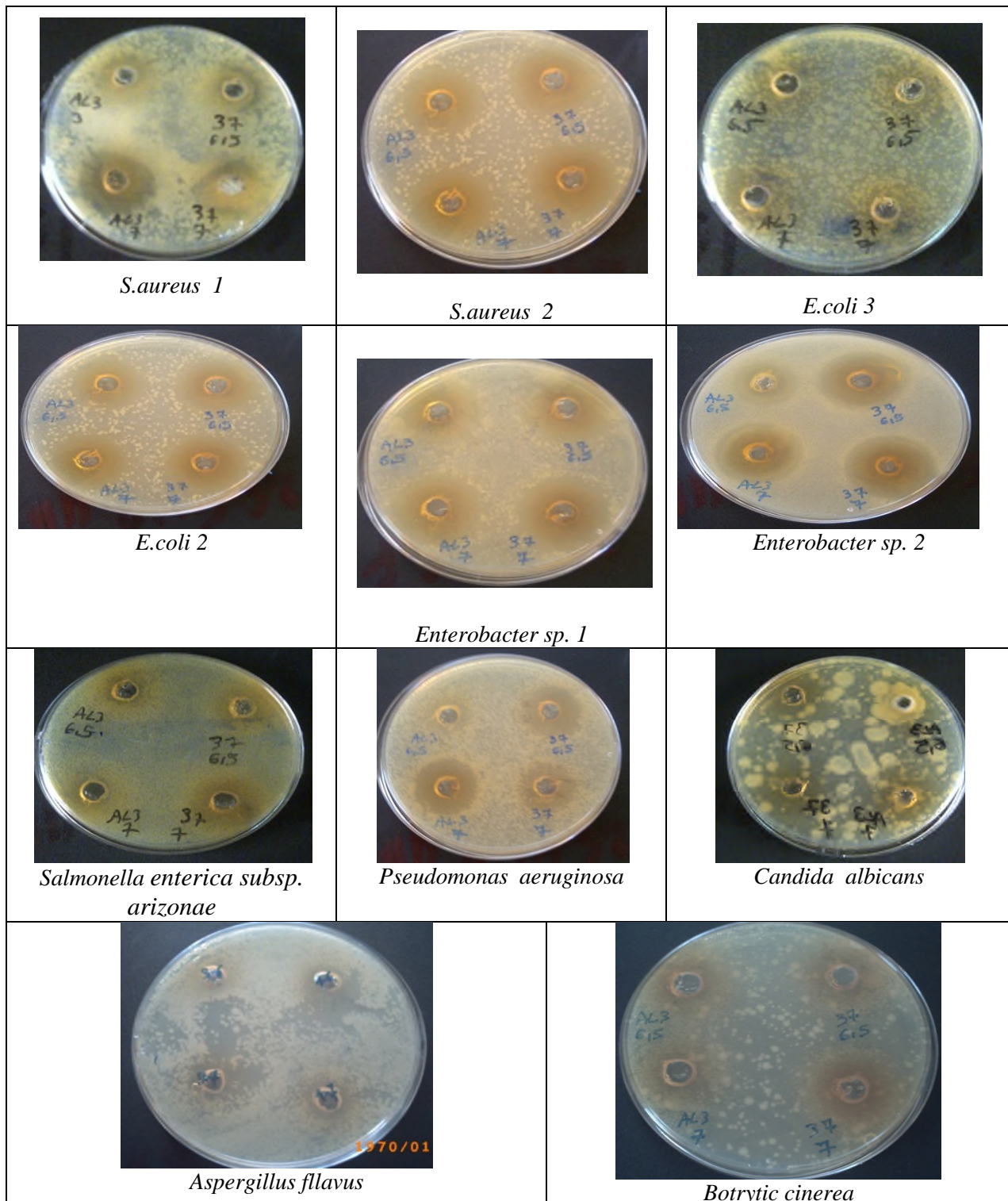
La présence de *Leuconostoc mesenteroides* spp. *dextranicum* dans les lait fermentés de type laban montre les caractéristiques les plus intéressantes pour sa tolérance au stress d'acidité et son activité antimicrobienne maximale contre *Salmonella* avec une zone d'inhibition de 20 mm de diamètre (Dib et al ,2012).

Selon Sanders et Klaenhammert (2001) l'antagonisme des bactéries lactiques envers les bactéries pathogènes peut s'expliquer par la production de composés antimicrobiens incluant les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle ou des protéines ou des peptides bactériostatiques ou bactéricides de type bactériocines.

4. Résultats de la recherche de l'origine de l'activité antimicrobienne

5.1. Test d'acidité

A fin de voir si l'activité antimicrobienne révélée par les surnageants concentrés de la culture des souches LnAL3 et Ln37 est due à la production d'acide organique, le pH de ses derniers a été testé à pH 6,5 puis à pH 7, les résultats sont illustrés dans la figure 15.



37-6,5 : surnageant de la souche Ln37 neutralisé à pH 6,5; 37-7 : surnageant de la souche Ln37 neutralisé à pH 7 ; AL3-6,5 : surnageant de la souche LnAL3 neutralisé à pH 6,5 ; AL3-7 : surnageant de la souche LnAL3 neutralisé à pH 7

Figure 15 : Résultats du test d'acidité.

Le surnageant concentré de la culture de la souche LnAL3 neutralisé à pH 6,5 et à pH 7 montre (figure 16) une même activité antimicrobienne vis-à-vis de *S. aureus 1* avec une zone d'inhibition de 24 mm, néanmoins il ne présente aucune activité antimicrobienne vis-à-vis d'*E.coli 3*, *E.coli 2*, *Salmonella enterica subsp. arizonae*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* et *Botrytis cinerea*.

Le surnageant concentré de la culture de la souche LnAL3 présente une plus grande activité antimicrobienne à pH 7 vis-à-vis de *S. aureus 2*, *Enterobacter 1*, *Enterobacter* et de *Pseudomonas 1*, avec respectivement des zones d'inhibitions de 28mm, 30mm, 28,5mm, 20,5mm de diamètres, par rapport au surnageant de LnAL3 à pH 6,5 avec respectivement 25,5mm, 29,5mm, 23,5mm et 17,5mm de diamètre.

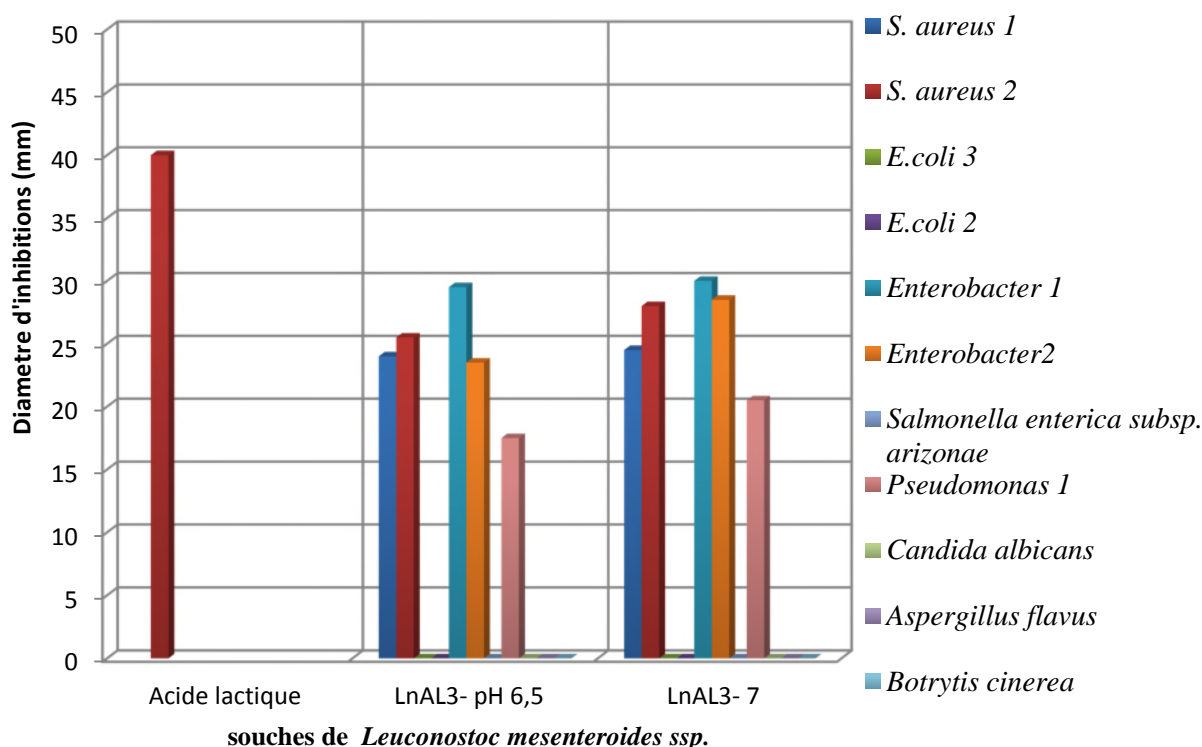


Figure 16 : Étude de l'effet du pH sur l'activité antimicrobienne des surnageants concentrés 10 fois de la culture des souches LnAL3.

Le surnageant concentré de la culture de la souche Ln37 neutralisé à pH 6,5 et à pH 7 montre (tableau 16) approximativement une même activité antimicrobienne vis-à-vis d'*Enterobacter 1*, *Pseudomonas 1* avec respectivement des zones d'inhibition de 29,5 mm et 21mm, néanmoins il ne présente aucune activité antimicrobienne vis-à-vis d'*E.coli 3*, *E.coli 2* et *Salmonella enterica subsp. arizonae*.

Le surnageant concentré de la culture de la souche Ln37 présente une plus grande activité antimicrobienne à pH 6,5 vis-à-vis de *S. aureus 2*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* et *Botrytis cinerea*, avec respectivement des zones d'inhibition de 29,5mm, 18,5mm, 13mm, 20mm de diamètre. Néanmoins le surnageant Ln37 à pH 7 présente une plus grande activité antimicrobienne vis-à-vis de *S. aureus 1* et d'*Enterobacter 2* avec respectivement des zones d'inhibition de 25mm et 28,5mm par contre elle ne présente aucune activité antimicrobienne vis-à-vis d'*Aspergillus flavus* à ce pH.

Le témoin de l'acide lactique à 30 % (figure 17) présente une zone d'inhibition de 40 mm de diamètre vis à vis de la souche *S.aureus 2*, ce qui témoigne de la sensibilité de la souche vis-à-vis de l'acidité.

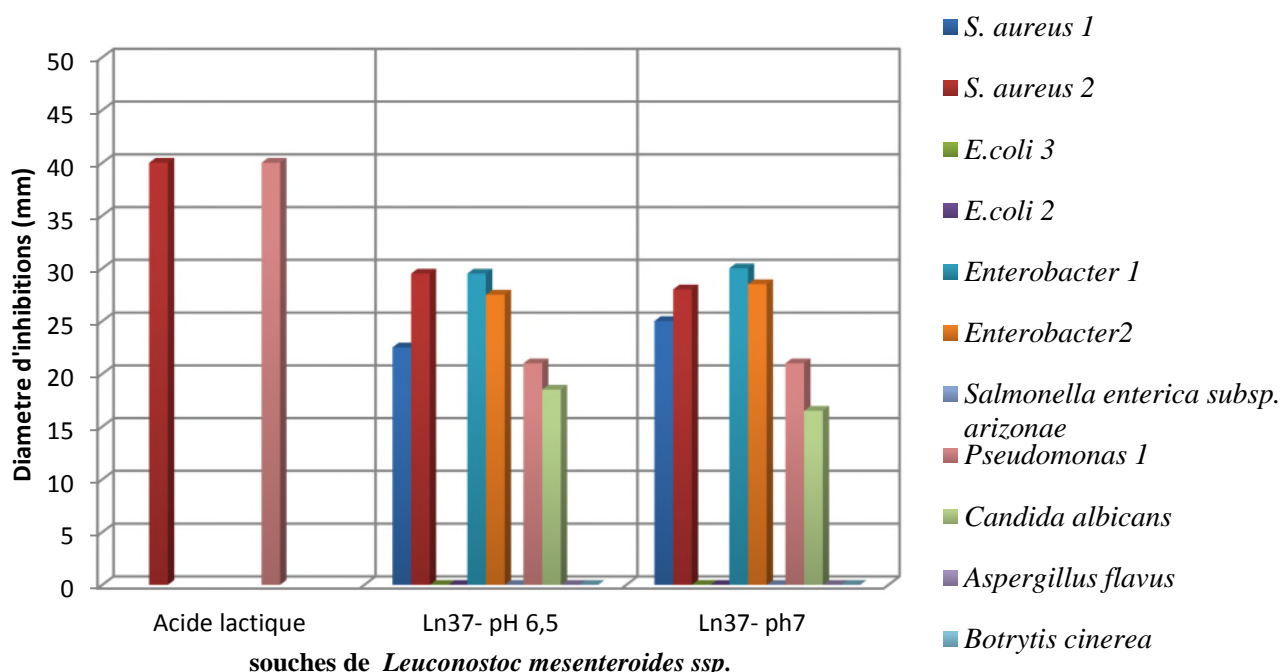


Figure 17 : Étude de l'effet du pH sur l'activité antimicrobienne des surnageants concentrés 10 fois de la culture de la souche Ln37.

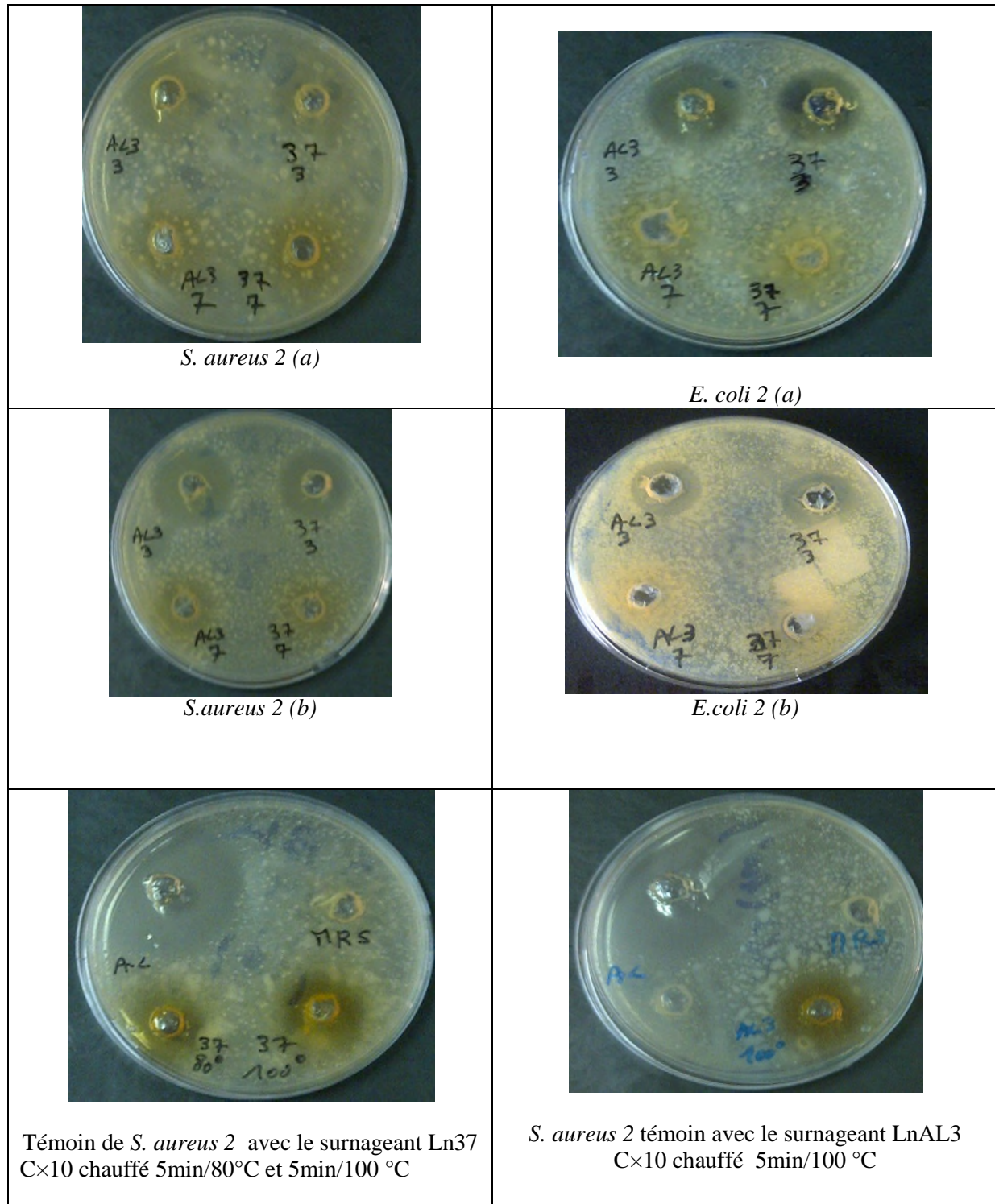
Daly et al. (1972) avaient constatés que le milieu de culture contenant de l'acide acétique inhibait *Staphylococcus aureus* seulement pour des valeurs de pH égales ou inférieures à 4,5. La forme non dissociée de l'acide peut être plus inhibitrice que la forme dissociée (Ross, 1981). Or l'acide acétique a un pKa de 4,7 et à pH = 4,5 il est principalement sous la forme non dissociée, tandis qu'à ce même pH, l'acide lactique est complètement dissocié puisque son pKa est de 3,9.

En effet les résultats obtenus sur l'étude de l'effet du pH ne peuvent pas à eux seuls expliquer l'activité antimicrobienne observée. En effet Daly et *al.* (1972) ont émis l'hypothèse que l'eau oxygénée pouvait jouer un rôle dans ces phénomènes d'inhibitions. La production d'acides organiques et (ou) d'eau oxygénée ne suffit pas à expliquer l'activité inhibitrice rencontrée. Aussi a-t-il été suggéré la production d'autres substances antimicrobiennes (Mather et Babel, 1959; Pinheiro et *al.*, 1968).

5.2. Test des protéases

A fin de vérifier si les souches de LnAL3 et Ln37 utilisées dans cette étude produisent en plus des acides organiques, des substances antimicrobiennes de nature protéique, un test de protéase a été réalisé.

Les résultats obtenus (figure 18 et 19) montrent qu'après 18 h d'incubation, les surnageants concentré des souches LnAL3 et Ln37 traités avec la pepsine puis chauffées à 80°C présentent des zones d'inhibition vis-à-vis d'*E.coli* 2 avec 23 mm diamètre.



37-3 : surnageant de la souche Ln37 traité avec la pepsine, **37-7** : surnageant de la souche Ln37 traité avec la trypsine, **AL3-3** : surnageant de la souche LnAL3 traité avec la pepsine, **AL3-7** : surnageant de la souche LnAL3 traité avec la trypsine, **(a)** : chauffage à 80°C, **(b)** : chauffage à 100°C, **AL** : acide lactique.

Figure 18 : Résultats du test des protéases

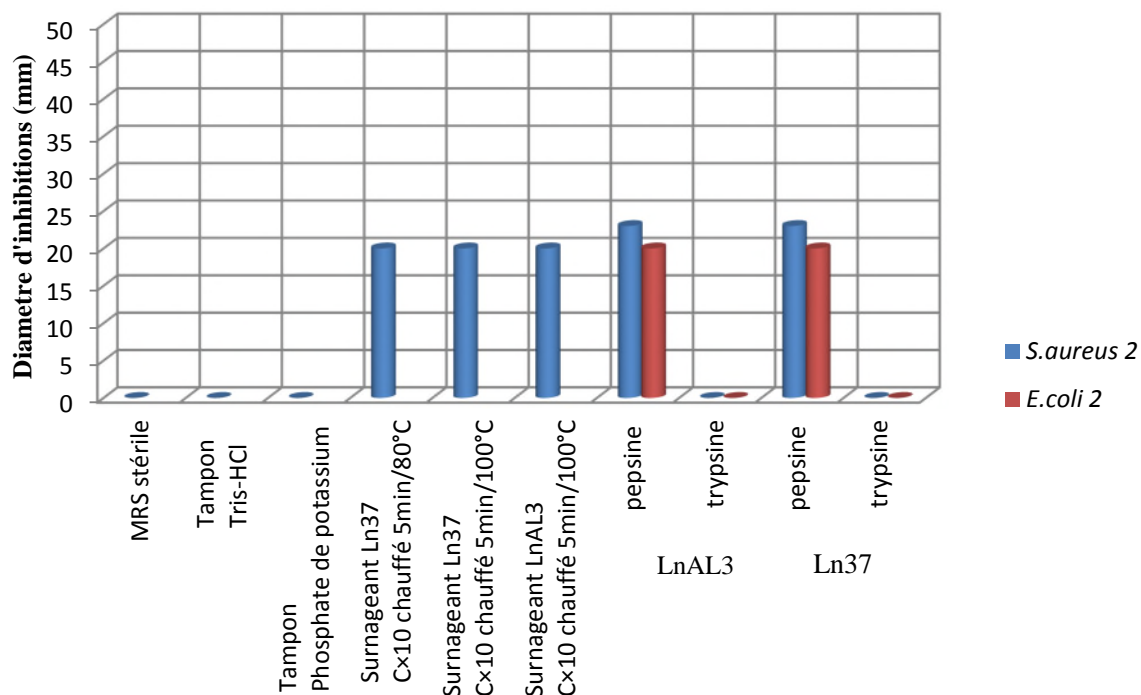


Figure 19 : Étude de l'effet des protéases sur l'activité antimicrobienne des surnageants concentrés 10 fois de la culture des souches LnAL3 et Ln37.

D'une autre part le surnageant concentré de la souche LnAL3 traité avec la pepsine puis chauffée à 80°C montrent des zones d'inhibitions vis-à-vis de *S. aureus 2* avec 26mm de diamètre. Tandis que celui de la souche Ln37 vis-à-vis de *S. aureus 2* montre une zone d'inhibitions de 22mm. Néanmoins aucune zone d'inhibition n'est obtenue avec les surnageants traités avec la trypsine vis-à-vis de la même souche cible.

Cependant, une zone d'inhibition de 20mm de diamètre est obtenue vis-à-vis de la souche testée *S. aureus 2* pour le surnageant de la souche Ln37 chauffé à 80°C non traité avec les protéases (témoin), ce qui témoigne de la sensibilité de la substance au traitement par les protéases.

Les résultats obtenus avec les surnageants concentrés des souches LnAL3 et Ln37 traités avec la pepsine puis chauffée à 100 °C montrent des zones d'inhibitions vis-à-vis de *S. aureus 2* et *E. coli 2* avec respectivement 23mm et 20mm de diamètre. Cependant aucune zone d'inhibition n'a été observée pour les surnageants traités avec la trypsine chauffée à 100 °C.

Néanmoins, des zones d'inhibitions de 20mm de diamètre, ont été notées vis-à-vis de la souche testée *S.aureus* 2 pour les surnageants des souches Ln37 et LnAL3 chauffés à 100°C non traité avec les protéases, ce qui témoigne de la thermostabilité et de la nature protéique de la substance antimicrobienne. En effet, les bactériocines biochimiquement ou génétiquement caractérisées de *Leuconostoc mesenteroides* se sont avérées stables à la chaleur (Cotter et al., 2005 ; Sade, 2011).

Les résultats obtenus pour l'origine de l'activité antibactérienne des souches de *Leuconostoc mesenteroides* montrent que l'effet antagoniste des surnageants concentrés de LnAL3 et Ln37 peut être attribué à une substance antimicrobienne active entre un pH de 3 à 7 et reste active aux chauffages pendant 5min à 80°C et à 100°C. Cette substance est complètement inactivée en présence de trypsine (protéase) ce qui suggère qu'elle est de nature protéique. Néanmoins cette substance antimicrobienne (probablement bactériocine) reste active en présence de la pepsine.

Effectivement peu d'informations sont disponibles sur la purification et la caractérisation des bactériocines produites par les leuconostocs d'origines laitiers. (Parente et al., 1996; Hemme et Foucaud-scheunemann, 2004 ; Xiraphiet et al., 2008).

Medina et al (2003) ont rapporté qu'après traitement du surnageant des bactéries lactiques avec des protéases telle que la trypsine, l' α -chymotrypsine et protéase K et après incubation à 37 °C pendant 24h, que l'effet antagoniste de ces dernières envers *S.aureus*, et la souche de *L.monocytogenes* a été inhibé et aucune zone d'inhibition n'a été observée.

Branen et al. (1975) à partir d'une souche de *Ln. citrovorum* (*Ln. cremoris*) ont purifié un peptide de bas poids moléculaire différant par son spectre antimicrobien, son poids moléculaire et sa localisation extracellulaire, des autres peptides antimicrobiens connus, produits par les bactéries lactiques telle que la nisine, la diplococcine ou l'acidophiline. Park et Marth (1972) ont confirmé les résultats d'inhibition vis-à-vis de *Salmonella typhimurium*.

Dans leur grande majorité, les bactériocines peptidiques de bactéries lactiques sont thermorésistantes (120°C pendant 10 minutes), stables dans des zones de pH de 3 à 8 et sensibles à l'action d'enzymes protéolytiques (présentes dans le tractus intestinal). De plus, contrairement à certains autres peptides antimicrobiens d'invertébrés et vertébrés, elles ne montrent pas d'activité hémolytique vis à vis des cellules eucaryotes (Nes et Holo, 2000).

CONCLUSION

Le présent travail réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée (équipe de microbiologie du lait et des probiotiques) avait pour but d'étudier l'effet antimicrobien des souches des trois souches de *Leuconostocs mesenteroides* (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Ln25), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LnAL3 et Ln37 à l'égard de plusieurs souches cibles.

De plus la sensibilité des souches utilisées a été testée envers quelques antibiotiques. Les résultats obtenus montrent une multi-résistance des souches utilisées aux antibiotiques testés tels que Cefoxitine et l'Ampicilline.

La mise en évidence de l'activité inhibitrice des souches de *Leuconostoc mesenteroides* vis-à-vis des souches cibles a été réalisée par des tests d'antagonismes directs (test des spots) et par diffusion (test des puits).

Les résultats enregistrés avec le test des spots ont montraient que les trois souches de *Leuconostocs mesenteroides* présentaient toute une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis des souches cibles d'un diamètre allant de 12,5mm à 50mm toutefois aucune zone n'est enregistré pour *candida albicans*, ce qui indique que les 3 souches de *Leuconostoc mesenteroides* sont capables de synthétiser des substances antimicrobiennes actives vis-à-vis des souches cibles.

Ces résultats obtenus montrent non seulement une très bonne activité antibactérienne des souches de *Leuconostoc mesenteroides* mais également une activité antifongique intéressante. Cependant la souche Ln25 a présentait la plus faible activité inhibitrice.

Les deux souches présentant la meilleure activité antimicrobienne de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (LnAL3 et Ln37) ont étaient sélectionnées pour le reste de l'étude (test des puits)

Afin de déterminer l'origine de l'activité antimicrobienne exprimée par les souches de *Leuconostoc mesenteroides* l'effet du pH (pH natif, pH 6,5 et pH 7) et l'effet du traitement avec les protéases (la trypsine et la pepsine) ont été testées.

Les résultats enregistrés avec le surnageant à pH natif des souches de *Leuconostoc mesenteroides* n'ont montrés aucune zone d'inhibition sauf vis-à-vis de la souche *Pseudomonas I*. Néanmoins les mêmes surnageants après concentration 4 fois ont montraient des zones d'inhibitions claires autours des puits, ce qui confirme la présence de substances antimicrobiennes dans ces surnageants.

Toutefois, les résultats obtenus avec les surnageants des souches LnAL3 et Ln37 concentrés 10 fois, ont montraient une meilleure activité antimicrobienne sur la croissance des souches cibles.

L'étude de l'effet du pH sur l'activité antimicrobienne des surnageants concentrés 10 fois de la culture des souches LnAL3 et Ln37 ont montré que l'effet antagoniste de ces derniers est due en partie à la production des acides organiques vue qu'une diminution ou l'absence de zones d'inhibition est obtenus après neutralisation à pH 6,5 ou à pH 7. Effectivement, une zone de 40 mm est obtenue par l'acide lactique à 30 % (témoin) ce qui témoigne de la sensibilité des souches vis-à-vis de l'acidité.

Néanmoins l'obtention des zones d'inhibition à pH 7 montre que l'activité antimicrobienne exprimée par les souches de *Leuconostoc mesenteroides* ne peut pas être due seulement à la production des acides organiques.

En effet aucune zone d'inhibition n'est obtenue avec les surnageants concentrés 10 fois traités avec la protéase trypsine, ce qui indique que l'activité antimicrobienne des souches de *Leuconostoc mesenteroides* est du aussi à la production d'une substance active de nature protéique cependant cette substance est résistante au traitement avec la pepsine et stable après chauffage à 100 °C pendant 5min.

Les résultats obtenus dans cette étude présente un grand intérêt industriel dans le domaine agro-alimentaire surtout dans les industries laitières et dans le domaine agricole. Ces résultats ouvrent la voie sur la possibilité d'utiliser le genre *Leuconostoc* plus exactement l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* ou ses substances comme bioconservateurs pour les produits à base de lait cru, assurant la qualité et la sécurité de ces aliments et des consommateurs. Ces souches pourraient être également utilisées dans la lutte biologique vis-à-vis des phytopathogènes.

Cependant, des études plus approfondies doivent être envisagées, parmi elles :

- ❖ Répétitions des tests et études de la signification des résultats obtenus (étude statistique) ;
- ❖ Tester ces souches sur un plus grand nombre de souches pathogènes d'origine différentes ;
- ❖ Détermination de la nature des métabolites antibactériens secrétés par les 3 souches de *Leuconostoc mesenteroides* ;
- ❖ Étude du potentiel probiotique de ses souches en vue d'une utilisation thérapeutiques ;
- ❖ Étude de l'effet antibactérien de ces souches lactiques sur des biofilms formés.

Références bibliographiques

- ❖ Agarwal KN, Bhasin SK. (2002). Feasibility studies to control acute diarrhea in children by feeding fermented milk preparations Actimel and Dahi. *European Journal of Clinical Nutrition*. **56**, S56–S59.
- ❖ Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K et Helander IM. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 2001–2005.
- ❖ Ammor S, Tauveron G, Dufour E et Chevallier I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*. **17**,454–461.
- ❖ Atanassova M, Choiset Y, Dalgalarrrondo M, Chobert JM, Dousset X, Ivanova I et Haertle T .(2003) .Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* strain M3. *International Journal Food Microbiology* .**87**, 63–73.
- ❖ Björkroth J et Holzapfel WH. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In : Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH et Stackebrandt E. *The Prokaryotes*. 3ème editions .New York: Editions Springer, Vol. 4, pp. 267-319.
- ❖ Branen AL, Go HC et Genske RP. (1975). Purification and Properties of Antimicrobial Substances Produced by *Streptococcus diacetilactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *Journal of Food Science*. Vol. 40, **3**, 446–450.
- ❖ Buyser ML et Sutrat L. (2005).*Staphylococcus aureus*. In : Federighi M. *bactériologie alimentaire 2ème Édition*. Edition Economica, Paris. pp. 1-13.

- ❖ Cabo ML, Braber AF et Koenraad PM. (2002). Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discoloris* due to acetic acid in the medium. *Journal of Food Protection*. **65**,1309-1316.
- ❖ Caplice E, Gerald F et Fitzgerald BC. (1999). Role of microorganisms in food production and Preservation. *International Journal of Food Microbiology*. **50**,131–149.
- ❖ Chung CH et Day DF. (2002). Gluco-oligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* B-742 (ATCC 13146): A potential prebiotic. *Journal of Industrial and Microbiological Biotechnology*. **29**, 196–199.
- ❖ Cogan TM. (2002). Improving Cheddar cheese flavor by microbiological way. 26th International Dairy Congress. London. 24–27.
- ❖ Cogan TM et Jordan K. (1994). Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *Journal of Dairy Science*. **77**, 2704-2717.
- ❖ Collins MD, Samelis J, Metaxopoulos J et Wallbank S. (1993). Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: Description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology*. **75**, 595–603.
- ❖ Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. (2013). From: <http://www.sfm-microbiologie.org/>. Accessed: 25/05/2012.
- ❖ Condon S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews*. **46**, 269–280.
- ❖ Cotter PD, Hill C et Ross RP. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. **3**,777-788.

- ❖ Daly C. (1972). Interactions of food starter cultures and food-borne pathogens: *Streptococcus diacetylactis* versus food pathogens. *Journal of Milk and Food Technology*. **35**, 349–357.

- ❖ Dessart S et RetSteenon LR.(1995) .Biotechnology of dairy *Leuconostoc*. In :Hui YH et Khachatourians GG . *Food Biotechnology: Microorganisms*. Editions Wiley-Interscience, New York, USA, pp. 665-702.

- ❖ De Ambrosini VM, Gonzalez S, Perdigon G, de Ruiz Holgado AP et Oliver G.(1996). Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chem Pharm Bull*. **44**, 2263-2267.

- ❖ Devoyod JJ, Muller M et Desmazeaud MJ. (1993) .La flore microbienne du fromage de Roquefort . Les streptocoques lactiques et les leuconostocs. Influence des différents microorganismes de contamination. *Le Lait*. **49**, 369–399.

- ❖ Devoyod JJ et Poullain F. (1988). Les leuconostocs. Propriétés: Leur rôle en technologie laitière. *Le Lait*. **68**, 249–280.

- ❖ Di Bella S, Capone A, Bordi E, Johnson E, Musso M, Topino S, Noto P et Petrosillo N.(2011).*Salmonella enterica ssp. Arizonae* infection in a 43-year-old Italian man with hypoglobulinemia: a case report and review of the literature. *Journal of Medical Case Reports*. **5**, 323-380.

- ❖ Dib H, Hajj Semaan E, Mrad R, Ayoub J, Choueiry L, Moussa H et Bitar G. (2012). Identification et évaluation de l'effet probiotique des bactéries lactiques isolées dans des fromages Caprins traditionnels. *Lebanese Science Journal*. **13**, 240-256.

- ❖ Dicks LM, Dellaglio F et Collins MD. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. International Journal of Systematic Bacteriology. **45**, 395–397.
- ❖ Djouzi Z, Andrieux C, Pelenc V, Somarriba S, Popot F, Monsan P et Szyliet O. (1995). Degradation and fermentation of α-gluco-oligosaccharides by bacterial strains from human colon: *In vitro* and *in vivo* studies in gnotobiotic rats. Journal of Applied Bacteriology. **79**, 117–127.
- ❖ Doumandji A, Hellal A et Said N. (2010). Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus* 11. Microbiologie Industrielle, Sanitaire, et Environnementale. **4**, 25-47.
- ❖ Ennahar S, Aoude-Werner D, Assobhei O et Hasselmann C. (1998). Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. Journal of Applied Microbiology. **85**, 521–526.
- ❖ Euzéby JP. (2009). List of prokaryotic names with standing in nomenclature - genus *leuconostoc*. From: <http://www.bacterio.cict.fr/l/leuconostoc.html>. Accessed 25/05/2012.
- ❖ Gálvez A, Abriouel H, Ben Omar N et Lucas R. (2011). Food Applications and Regulation. In: Drider Det Rebuffat S. Editions: Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp 253-390.
- ❖ Garvie EI. (1986). Genus *Leuconostoc* van Tieghem 1878, 198AL emended mut. In: Sneath PH, Mair NS. Sharpe MS et Holt JG. Edition Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 1071-1075.
- ❖ Genske RP et Branen AL. (1973). Properties of antimicrobial substances with *S. diacetylactis* and *L. citrovorum*. Modern Dairy, **52**, 8, 12-14.

- ❖ Gilarová R, Voldrich M, Demnerová K, Cerovský M et Dobiás J.(1994) Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *The International Journal of Food Microbiology*. **24**, 315-319.

- ❖ Guiraud JP. (2003).*Microbiologie Alimentaire*. Éditions Dunod, Paris. , 649p.

- ❖ Héchard Y, Renault D, Cenatiempo Y, Letellier F, Maftah A, Jayat C, Bressolier P, Ratinaud MH, Julien R, Fleury Y et Delfour A. (1993). Les bactériocines contre *Listeria* : une nouvelle famille de protéines. *Le Lait* .**73**, 207-213.

- ❖ Hemme D et Foucaud-Scheunemann C.(2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*. **14**, 467-494.

- ❖ Holland R. et Liu S-Q.(2011) Lactic Acid Bacteria : *Leuconostoc spp.**International Dairy Journal*. **15**, 711-718.

- ❖ Holzapfel WH, Bjorkroth J et Dicks Lm. (2009). Genus I. *Leuconostoc* van Tieghem 1878, 198 emend mut. char. Hucker and Pederson 1930, 66AL. In: De Vos P, Garrity GD, Jones NR , Krieg W , Ludwig FA , Rainey K , Schleifer WB. Whitman (Eds.) .*Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3. Springer, New York, USA,

- ❖ Huang DQ, Prévost H et Dives C. (1994). Principal characteristics of α -galactosidase from *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*. *Journal of Basic Microbiology*. **34**, 87–95.

- ❖ Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, Møller PL, Michaelsen KF, Pærregaard A, Sandström B, Tvede M, et Jakobsen M. (1999). Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus spp.* by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**,4949-4999.

- ❖ Jeppesen VF et Huss H. (1993a). Characteristics and antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from chilled fish products. *International Journal of Food Microbiology*. **18**, 305-320.

- ❖ Jeppesen VF et Huss H. (1993b) Antagonistic activity of two strains of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* .**19**, 179-186.

- ❖ Jiménez H. (2008). Une nouvelle vision de la proto-coopération entre *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii*ssp. *bulgaricus* par des approches post-génomiques. Thèse de Doctorat de Biologie, Biochimie Bactérienne Université de Grenoble, France ,229p.

- ❖ Juffs HS et Babel FJ. (1975). Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactic cultures in milk stored at low temperature. 1. *Dairy Science*. **58**, 1612-1619.

- ❖ Kekkonen RA, Kajasto E, Miettinen M, VeckmanV, Korpela R et Julkunen I . (2008).Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN- γ production. *World Gastroenterol*. Volume **8**.14, 1192-1203.

- ❖ Kim CH, Ji GE et Ahn C. (2000). Purification and molecular characterization of a bacteriocin from *Pediococcus* sp. KCA1303–10 isolated from fermented flatfish. *Food Science Biotechnology*. **9**,270–276.

- ❖ Kim M et Chun J. (2005). Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *International Journal of Food Microbiology* .**103**, 91-96.

- ❖ Klaenhammer TR. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*.**70**, 337-349.

- ❖ Levata-jovanovic M et Sandine WE. (1997). A method to use *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris 91404* to Improve milk fermentations .Journal of Dairy Science. **1**,66-98.

- ❖ Makhloufi KM. (2012).Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudo mesenteroides* isolée du boza. Thèse de doctorat de Microbiologie, Biochimie .Université de Pierre et Marie Curie, France ,200p.

- ❖ Marth EH. (1962). Certain aspects of starter culture metabollam. Journal of Dairy Science. **5**, 430-504.

- ❖ Marth EH et Hussong RV. (1963).Effects of skim milk cultured with *Leuconostoc citrovorum* on groxth of some bacteria and yeast .Journal of Dairy **.46**, 1033-1037.

- ❖ Martley Fg et Crow VL.(1993). Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. International Dairy Journal. **3**, 461–483.

- ❖ Martley FG et Crow VL. (1996). Open texture in cheese: The contributions of gas production by microorganisms and cheese manufacturing practices. Journal of Dairy Research. **63**, 489–507.

- ❖ Matamoros S , Leroi F ,Cardinal M , Gigout F ,Chadli FK , Cornet J , Prevost H et Pilet MH .(2009). Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. Journal of Food Protection. **72**, 365-374.

- ❖ Mather Dw et Babel FJ. (1959). Inhibition of certain types of bacterial spoilage in creamed cottage cheese by the use of cream mixture prepared with *Streptococcus urovoru*. J. Dairy Science **.2**, 118-203.

- ❖ McLeod A, Nyquist OL, Snipen L ,Naterstad K et Axelsson L . (2008) Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Systematic and Applied Microbiology* .**31**, 393-403.
- ❖ Medina R, Katz M, Gonzalez S et Oliver G. (2001). Characterization of the lactic acid bacteria in ewe`smilk and cheese from north west Argentina. *Journal of Food Protection* .**64**, 559-563.
- ❖ Morishita T ,Tamura N , Makino T et Kudo S . (1999). Production of menaquinones by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. **82**, 1897–1903.
- ❖ Morisset D. (2011).Étude des relations structure/fonction d`une bactériocine anti-*Listeria*, la méésentéricine Y105. Thèse de doctorat d`Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie .Université de Poitiers, France ,247p.
- ❖ Nes IF et Holo H. (2000).Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*. **1**, 50-61.
- ❖ Olivares W ,Wacher-Rodarte C , Le Borgne S et L"opez-Munguia A . (2002). Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum*strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **28**, 112–117.
- ❖ Parente E, Moles M et Ricciardi A. (1996). Leucocin F10, a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*. *International .Journal of Food Microbiology* .**33**, 231-243.
- ❖ Park HS et Marth EH.(1972). Inactivation of *Salmonella typhimurium* by sorbic acid. *Journal of Milk Food Technol*. **35**, 532–539.

- ❖ Penaud S. (2006).Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *L. delbrueckii* sp. *Bulgaricus* ATCC11842. Thèse de Doctorat. Institut national agronomique de Paris-grignon,300p.

- ❖ Perscott L, Harley J et Klein D. (2003).Microbiologie. 2^{ème} édition, éditions de Boeck, Bruxelles, 400p.

- ❖ Pilet M, Magras C et Federighi M. (2005).Bactériologie Alimentaire. In: Federighi M 2^{ème} édition, éditions. Economica, Paris, pp.29-31.

- ❖ Pinheiro AJ, Liska BJ et Parmelee CE. (1968).Inhibitory effect of selected organic chemicals on *Pseudomonas fragi*. Journal of Dairy Science. **51**,223-224.

- ❖ Rammelsberg M, Müller E et Radler F. (1990). Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. Archives of Microbiology. **154**, 249-252.

- ❖ Rodrigues UM , Aguirre M , Facklam RR et Collins MD. (1991) Specific and intraspecific molecular typing of *lactococci* based on polymorphism of DNA encoding rRNA. Journal of Applied Microbiology.**71**, 509-516.

- ❖ Ross RP, Morgan S et Hill C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. The International Journal of Food Microbiology.**79**, 3-16.

- ❖ Säde E. (2011). *Leuconostoc* spoilage of refrigerated, packaged foods. Thèse de Doctorat. University of Helsinki. Faculty of Veterinary Medicine. Finland.57p.

- ❖ Sanders Me et Klaenhammer TR. (2001). The Scientific Basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM Functionality as a Probiotic. Journal of Dairy Science .**84**, 319 331.

- ❖ Sorrells KM et Speck ML. (1970). Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*. *Journal of Dairy Science*. **53**, 239-241.

- ❖ Stahl JP. (2006). Qualité de la relation médecin-malade : impact sur l'antibiothérapie de facteurs non infectieux. *Antibiotiques*.**8**,17-22.

- ❖ Stiles ME. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* .**70**, 331-345.

- ❖ Trias R, Bañeras L, Badosa E et Montesinos E. (2008). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acidbacteria. *International Journal of Food Microbiology* .**123**, 50–60.

- ❖ Vedamuthu ER. (1994). The dairy *Leuconostoc*: Use in dairy products. *Journal of Dairy Science*. **77**, 2725–2737.

- ❖ Vignola CL. (2002).*Science et technologie du lait*.90p.

- ❖ Von Weymarn N, Hujanen M et Leisola M. (2002). Production of d-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*.**37**, 1207–1213.

- ❖ Xiraphi N,Georgalaki M, Rantsiou K, Cocolin L,Tsakalidou E et Drosinos EH .(2008). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides E131*. *Meat Science*. **80**, 194-203.

- ❖ Yoon SH et Robyt JF. (2002). Synthesis of acarbose analogues by transglycosylation reactions of *Leuconostoc mesenteroides B- 512FMC and B-742CB dextran*sucrases. *Carbohydrate Research*. **337**, 2427–2435.

Annexes

Annexe I : Etude bibliographique

Tableau I : Caractéristiques de quelques bactéries lactiques (Makhloufi, 2012).

Bactérie lactique	Propriétés cellulaires		Propriétés biochimiques			Informations génétiques	
	Aspect	Habitat	T° optimale °C	CO ₂	Acide lactique	GC%	Taille génome (Mpb)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	bacille	intestin	37	-	D, L, (D+L)	59	2,1
<i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A	bacille	intestin, tractus génital	37-41	-	D, L, (D+L)	60	2,3
<i>Carnobacterium sp.</i> AT7	bacille, chaîne	viande, poisson	25-43	-	L	35	2,4
<i>Enterococcus faecalis</i> AR01/DG	coque isolé	intestin	37	-	L	37	2,8
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	bacille, chaîne	lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-42	+/-	D, L, (D+L)	46	2,9
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	bacille	lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-41	+/-	D, L, (D+L)	51	2,1
<i>Lactobacillus helveticus</i> DPCE 4571	bacille	Fromage	25-36	+/-	D, L, (D+L)	37	2,1
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	bacille isolé	plante, tractus gastro-intestinal	25-35	+/-	D, L, (D+L)	44	3,3

<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016	bacille, chaîne	lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-37	+/-	D, L, (D+L)	38	2
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	bacille	lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-38	+/-	D, L, (D+L)	46	3
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	bacille	lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-39	+/-	D, L, (D+L)	41	1,9
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	bacille	lait, tractus gastro-intestinal et vaginal	25-40	+/-	D, L, (D+L)	32	1,8
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11	Coque, chaîne, paire	Lait, fromage, yaourt	40	-	L	35	2,4
<i>Leuconostoc citreum</i> KM20	Coque isolé	viande Plante,	20-30	+	D	38	1,8
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Mesenteroides</i> ATCC8293	Coque isolé, chaîne, paire	viande Plante,	40	+	D	37	2
<i>Oenococcus oeni</i> PSU-1	Coque isolé, chaîne	vin	17-25	+	D	37	1,8
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	tétrade	Viande, plante, fromage	30	-	D, L	37	1,8
<i>Streptococcus agalactiae</i> A909	Couque isolé	Peau	37	-	L	35	2,1
<i>Weissella paramesenteroides</i> ATCC 33313	Couque isolé	Plante	30	+	D, L, (D+L)	37	1,9

+ : Production du dioxyde de carbone (CO₂).

- : Absence de production de CO₂.

D : l'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration D .

L : l'isomère optique formé de l'acide lactique est de configuration L.

D+L : l'acide lactique est sous forme racémique.

Une tétrade est formée lorsque quatre bactéries sont associées entre elles.

Tableau II: Caractéristiques phénotypiques de différenciation des souches de *Leuconostoc mesenteroides* subsp.

(Björkroth et Holzapfel. 2006, Holzapfel et *al.*, 2009 ; Holland et Liu, 2011).

Caractéristiques	<i>Ln. mesenteroides</i> subsp.		
	<i>cremoris</i>	<i>mesenteroid</i>	<i>dextraninum</i>
Morphologie cellulaire	Coccoid à cocci allongée	Coccoid à cocci allongée	Coccoid à cocci allongée
Provenance des acides :			
Amygdalin			
Arabinose	ND	ND	ND
Arbutin	-	+	-
Cellulose	-	d	-
Cellobiose	-	d	d
Fructose	-	d	-
Glucose	-	+	+
Galactose	+	+	+
Lactose	+	+	d
Maltose	d	d	+
Mannitol	-	+	+
Mannose	-	d	-
Melibiose	-	d	d
Raffinose	-	d	d
Ribose	-	d	d
Salicine	-	d	+
Sucrose	-	d	-
Trehalose	-	+	+
Xylose	-	+	+
	-	d	d
Ammoniac à partir d'Arginine	-	-	-
Configuration de l'acide lactique	D(-)	D(-)	D(-)
Hydrolyse de l'esculine	-	+	+
Production de dextrane	-	+	+
Croissance à pH 4,8	-	-	-
Croissance à 6,5% NaCl	-	+	-

Croissance à 10°C	+	+	+
37°C	-	d	+
45°C	-	-	-
Croissance à 10% d'éthanol	-	-	-
Exigence en TJF	-	-	-
Présence de NAD-dépendent G6PDH	+	+	+
Type de peptidoglycane	Lys-Ser-Ala ₂	Lys-Ser-Ala ₂	Lys-Ser-Ala ₂
Mol %G+C dans l'ADN	38-40	37-39	37-40
Production de bactériocine	ND	ND	ND

Symbole et abréviation : +, 90% ou plus des souches positives ; -:90% ou plus des souches négative ; d, 11-98% des souches positive ; ND, non déterminer ; TJF, facteur du jus de tomate ; NAD-dépendant G6PDH, nicotinamide adénine dinucléotide-dépendent glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Tableau III: Caractéristiques générales des contaminants des denrées alimentaires.

Espèce type	Caractères morphologiques	Caractères cultureux	Propriétés biochimiques	Pouvoir pathogène	Références
<i>Escherichia coli</i>	Gram négatif bâtonnet, asporulés, acapsulés, mobiles par ciliature péritriche	AAF. Sur bouillon nutritif trouble homogène. Sur milieu EMB, colonies d'un violet foncé avec éclat métallique verdâtre caractéristique d' <i>E.coli</i> .	<i>E .coli</i> réduit les nitrates, fermente avec production de gaz le glucose, le lactose et le mannitol. Elle produit l'indole à partir du tryptophane et ne produit pas d' H ₂ S.	<i>E.coli</i> peut jouer un rôle pathogène dans les infections des voies urinaires, méningites, septicémies. Certaines provoquent des gastroentérites infantiles.	(Guiraud, 2003)
<i>Salmonella enterica subsp. arizonae</i>	Gram négatif, bacille.	Aéro anaérobie facultatif.	Fermente le lactose au moins de 48 h. Utilise le malonate, liquéfier la gélatine et elle est incapable de se développer en présence de KCN (cyanure de potassium).	Hôte normal de l'intestin des reptiles. Elle peut être responsable de gastro entérite chez les jeunes enfants et les immunodéprimés qui sont en contact directe de reptiles.	(Di bella et al., 2011)
<i>Enterobacter</i>	Gram négatif, bacille, chimio-hétérotrophes. immobiles ou mobiles par ciliature péritriche	Aéro anaérobies facultatifs, cultivent sur milieux ordinaires.	Utilisent le glucose par métabolisme fermentaire avec ou sans production de gaz .réduisent les nitrates en nitrite, réaction oxydase négative.	Responsable de méningite et de gastro entérite.	(Guiraud, 2003)
<i>S.aureus</i>	Gram positif, cocci, en amas (grappes de raisin) , chimio-hétérotrophes	Aéro anaérobies facultatifs, germe mésophile, halotolérant.sur gélose nutritive <i>S.aureus</i> forme des colonies circulaires, à bord régulier bombées et brillantes.sur milieu chapman les colonies sont pigmentées en	oxydase négative, catalase positive, présence d'une coagulase libre.	Responsable d'infections suppuratives, septicémies et de toxi-infections alimentaires.	(Buyser et al ., 2005)

		jaune dorée.			
<i>Pseudomonas</i>	Bacilles à Gram négatif, asporulés, acapsulés, immobiles ou mobiles par des cils polaires.	Aérobies stricts, peu exigeantes, cultivant à 30 °C ; production de pigments.	oxydase + ; catalase -, Indole -	Responsable de gastro entérites très graves. Elle contamine fréquemment les produits alimentaires qu'elle peut dégrader de façon importante.	(Guiraud, 2003)
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i> est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre <i>Candida</i> .	Colonie blanche crème, luisant et crémeuse sur gélose sang ou sabouraud.	Test de l'uréase négatif sur milieu Christensen.	Elle provoque des infections fongiques (candidiase ou candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique.	(Perscott, 2003)
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i> est une espèce de champignon ascomycète.	Sur milieu <i>Aspergillus flavus parasiticus</i> agar (AFPA), revers orange caractéristique.	T° optimum de croissance : de l'ordre de 33°C, T° min. 10-12°C, T° max. : 43-48°C Aw minimale : 0.78 à 33°C, 0.80 à 37°C pH optimum de croissance : [3.4 ; 10] avec un pic à 7.5.	<i>A. flavus</i> élabore divers métabolites toxiques, mais surtout des aflatoxines, mycotoxines hépato-toxiques, notamment l'aflatoxine B1 qui est l'un des plus puissants hépato-carcinogènes connus à l'heure actuelle.	(Perscott, 2003)
<i>Botrytis cinerea</i>	C'est un champignon qui affecte de nombreuses espèces végétales.		Hygrométrie supérieure à 95%, T° moyennes entre 16°C et 23°C.	Responsable de la pourriture grise et de la pourriture noble.	(Perscott, 2003)

Annexe II : partie pratique (matériel et méthodes)

Le test de catalase

Sur une lame, au contact d'une colonie isolée sur le milieu approprié, on dépose une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂).

L'apparition d'une effervescence indique la présence d'une catalase.

L'absence d'une effervescence indique L'absence d'une catalase.

La coloration de Gram

❖ Réalisation du frottis

Une goutte d'eau distillée stérile est déposée sur une lame, à l'aide d'une pipette pasteur stérilisée, on prélève une colonie isolée et on l'ajoute à la goutte d'eau, puis on étale et on fixe au bec Benzen.

❖ Réalisation de la coloration

Après réalisation du frottis, la coloration de Gram est réalisée :







- Recouvrir le frottis de quelques gouttes de violet de gentiane (VG) ; laisser en contact pendant 1 mn ; puis jeter l'excès de VG.
- Recouvrir de Lugol, laisser en contact pendant 1 mn, jeter l'excès de Lugol.
- Décolorer à l'éthanol à 70 %, goutte à goutte, en inclinant la lame jusqu'à décoloration.
- Rincer à l'eau rapidement (avec un jet de pissette) ;
- Recolorer avec la fuschine, laisser en contact pendant 1 mn ;
- Rincer à l'eau ;
- Sécher la lame rapidement au bec benzen ;
- Observez avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement ×1000).






❖ Observation

Les Gram + apparaissent en violet.

Les Gram – apparaissent en rose.

Tableau IV : Matériel et appareillage utilisés au cours de l'expérience.

Matériels/appareils	photos
Centrifugeuse : (Potina 380R, Hettich, Zentrifugeu)	
Bain marie (thermostatic bath raypa)	
Etuves : A (30°C) (memmert) B (37°C) (melag, shalter) C (40°C) (memmert)	
Microscope optique (zeisswesrgermany)	
Compteur de colonie (suntexcolony counter570)	
Vortex (VELP scientifica)	

Plaque chauffante (Velpscientifica)	
Four pasteur (heraeus GSgepruflesicherheit)	
pH mètre (hanna pH 211, instruments microprocessor pH Meter)	
Balance portable (sartorius)	
Balance analytique (Adventure, OHAUS)	
Lyophilisateur (christ LOC, 1m) utilisé à 15mBar.	

ANNEXE III : PARTIE PRATIQUE (RÉSULTATS ET DISCUSSION)
Tableau V : pH des cultures de 18h des souches de *Ln mesenteroides*.

Souches tests	pH à 22,5°C
Ln25	4,34
LnAL3	4,51
Ln37	4,44

Tableau VI : pH des cultures de 18h des souches pathogènes.

Souches cibles	pH à 22,7°C
<i>S.aureus 2</i>	5,88
<i>E.coli 1</i>	6,58
<i>E.coli 2</i>	5,90
<i>Enterobacter sp. 1</i>	5,70
<i>Enterobacter sp. 2</i>	5,42
<i>Salmonella enterica subsp. arizonae</i>	5,69
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,80

Tableau VII: Normes pour la lecture de la sensibilité des souches aux antibiotiques (CASFM, 2013)

Antibiotiques	Diamètres critiques (mm) S	Diamètres critiques (mm) R
Oxacilline	≥ 27	< 25
Cefoxitine	≥ 22	< 15
Spiramycine	≥ 24	< 19
Ampicilline	≥ 21	< 16
Vancomycine	≥ 17	-
Cephalexine	≥ 18	< 12

Tableau VIII : Résultats du test des spots.

Souches		Souches tests (Zones d'inhibitions en mm)		
		Ln25	LnAL3	Ln 37
Souches cibles	<i>S.aureus 1</i>	28,33±2,39	45±5	50±0
	<i>S.aureus 2</i>	22,33±1,74	40±0	26,5±6,5
	<i>E.coli 1</i>	21±4	32±8	36,5±3,5
	<i>E.coli 2</i>	19±1	32,5±2,5	31±1
	<i>Enterobacter sp. 1</i>	15,5±0,5	22,5±2,5	25±0
	<i>Enterobacter sp. 2</i>	16,5±0,5	28±1	28±0
	<i>Salmonella enterica subsp. arizonae</i>	20±0	30±0	30±0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,5±2,5	18±4	21±1
	<i>Candida albicans</i>	Abs	Abs	Abs
	<i>Aspergillus flavus</i>	Grande zone ≤ 50	Grande zone ≤ 50	Grande zone ≤ 50
	<i>Botrytis cinerea</i>	18±8	26±14	27±9

Tableau IX: pH des surnageants natifs des souches de *Ln mesenteroides*.

Souches tests	pH
LnA13	4,80
Ln37	4,37

Tableau X : Résultats du test des puits avec le surnagent natif.

Souche		Souches tests (Zones d'inhibitions en mm)	
		LnAL3	Ln37
Souches cibles	<i>S.aureus 1</i>	Abs	Abs
	<i>S.aureus 2</i>	Abs	Abs
	<i>E.coli 1</i>	Abs	Abs
	<i>E. coli 2</i>	Abs	Abs
	<i>Enterobacter sp. 2</i>	Abs	Abs
	<i>Enterobacter sp. 1</i>	Abs	Abs
	<i>Salmonella enterica subsp. arizonae</i>	Abs	Abs
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21±1	20 ±0

Tableau XI : Résultats du test des puits avec le surnagent concentré 4 fois.

Souche		Souches tests (Zones d'inhibitions en mm)	
		LnAL3	Ln37
Souches cibles	<i>S.aureus 1</i>	27,5±4,5	25 ±5
	<i>E.coli 1</i>	25±0	25±0
	<i>Enterobacter sp. 1</i>	20±0	15±0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28±0	20±0

Tableau XII : pH des surnageants concentrés 10 fois des souches de *Ln mesenteroides*.

Souches tests	pH
LnA13	5,07
Ln37	5.43

Tableau XIII : Résultats du test des puits avec le surnageant concentré 10 fois.

zones d'inhibitions Souches	Zones d'inhibitions (en mm) obtenues avec les surnageants concentrés 10 fois.	
	LnAL3	Ln37
<i>S. aureus 1</i>	24,5±0,5	29±1
<i>S. aureus 2</i>	31±1	29±1
<i>E.coli 3</i>	15,5±0,5	17,5±0,5
<i>E. coli 2</i>	19.5±3.5	19.5±2.5
<i>Enterobacter sp. 1</i>	28,5±,5	28±2
<i>Enterobacter sp. 2</i>	26±1	28,5±1,5
<i>Salmonella enterica subsp. arizonae</i>	19±1	21±1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31,5±0,5	32±0
<i>Candida albicans</i>	21±1	19,5±4,5
<i>Aspergillus flavus</i>	28±0	15±0
<i>Botrytis cinerea</i>	50±0	17±0

Tableau XIV: Résultats du test des puits avec le surnageant concentré 10 fois neutralisé.

zones d'inhibitions Souches	Zones d'inhibitions (en mm) obtenues avec les surnageants concentrés 10 fois neutralisé			
	LnAL3		Ln37	
	pH=6,5	pH=7	pH=6,5	pH=7
<i>S. aureus 1</i>	24±6	24,5±1,5	22,5±2,5	25±5
<i>S. aureus 2</i>	25,5±0,5	28±2	29,5±3,5	28±2
<i>E.coli 3</i>	Abs	Abs	Abs	Abs
<i>E. coli 2</i>	Abs	Abs	Abs	Abs
<i>Enterobacter sp. 1</i>	29,5±2,5	30±3	29,5±2,5	30±3
<i>Enterobacter sp. 2</i>	23,5±1,5	28,5±1,5	27,5±0,5	28,5±1,5
<i>Salmonella enterica subsp. arizonae</i>	Abs	Abs	Abs	Abs
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17,5±2,5	20,5±4,5	21±0	21±1
<i>Candida albicans</i>	Abs	Abs	18,5±1,5	16,5±0,5
<i>Aspergillus flavus</i>	Abs	Abs	13±0	Abs
<i>Botrytis cinerea</i>	Abs	Abs	20±0	16±0

Tableau XV: Préparation des solutions tampon.**1) Tampon phosphate-citrate (pH 2,2-8,0)**

Préparer une solution d'acide citrique 0,50 M (soit 105,06 g de C₆H₇O₈, H₂O sec par litre) et une solution de phosphate de sodium disodique 0,50 M (soit 71,01 g de Na₂HPO₄ sec par litre).

Mélanger suivant les indications du tableau et diluer à 200 ml.

pH	Na₂HPO₄ à 0,50M	Acide citrique à 0,50M	pH	Na₂HPO₄ à 0,50M	Acide citrique à 0,50M
2,2	1,60 ml	39,20 ml	5,2	42,88 ml	18,56 ml
2,4	4,96 ml	37,52 ml	5,4	44,60 ml	17,70 ml
2,6	8,72 ml	35,64 ml	5,6	46,40 ml	16,80 ml
2,8	12,68 ml	33,66 ml	5,8	48,36 ml	15,82 ml
3,0	16,44 ml	31,78 ml	6,0	50,52 ml	14,74 ml
3,2	19,76 ml	30,12 ml	6,2	52,88 ml	13,56 ml
3,4	22,80 ml	28,60 ml	6,4	55,40 ml	12,30 ml
3,6	25,96 ml	27,12 ml	6,6	58,20 ml	10,90 ml
3,8	28,40 ml	25,80 ml	6,8	61,80 ml	9,10 ml
4,0	30,84 ml	24,58 ml	7,0	65,88 ml	7,06 ml
4,2	33,12 ml	23,44 ml	7,2	69,56 ml	5,22 ml
4,4	35,28 ml	22,36 ml	7,4	72,68 ml	3,66 ml
4,6	37,40 ml	21,30 ml	7,6	74,92 ml	2,54 ml
4,8	39,44 ml	20,28 ml	7,8	76,60 ml	1,70 ml
5,0	41,20 ml	19,40 ml	8,0	77,80 ml	1,10 ml

2) Tampon phosphate (pH 5,6-8,0)

Préparer une solution de di-hydrogénophosphate de potassium à M/15 (soit 9,08 g de KH_2PO_4 par litre) et une solution de di-sodium hydrogénophosphate (9,47 g de Na_2HPO_4 par litre).

Mélanger suivant les indications du tableau.

pH	Na_2HPO_4 à M/15	KH_2PO_4 à M/15
5,6	10,0 ml	190,0 ml
5,8	16,5 ml	183,5 ml
6,0	25,0 ml	175,0 ml
6,2	36,0 ml	164,0 ml
6,4	53,5 ml	146,5 ml
6,6	74,5 ml	125,5 ml
6,8	99,0 ml	101,0 ml
7,0	122,0 ml	78,0 ml
7,2	143,0 ml	57,0 ml
7,4	161,0 ml	39,0 ml
7,6	172,5 ml	27,5 ml
7,8	182,5 ml	17,5 ml
8,0	189,0 ml	11,0 ml

Tableau XVI : Résultats de l'étude de l'effet pH du surnageant concentré 10 fois traité avec des protéases chauffé à 80°C.

zones d'inhibitions Souches	Zones d'inhibitions (en mm) obtenues avec les surnageants concentrés 10 fois traités avec des protéases			
	LnAL3		Ln37	
	pepsine	trypsine	pepsine	Trypsine
<i>S. aureus 2</i>	26	Abs	22	Abs
<i>E.coli 2</i>	23	Abs	23	Abs

Tableau XVII : Résultats de l'étude de l'effet pH du surnageant concentré 10 fois traité avec des protéases chauffés à 100°C.

zones d'inhibitions Souches	Zones d'inhibitions (en mm) obtenues avec les surnageants concentrés 10 fois traités avec des protéases			
	LnAL3		Ln37	
	pepsine	trypsine	pepsine	trypsine
<i>S. aureus 2</i>	23	Abs	23	Abs
<i>E.coli 2</i>	20	Abs	20	Abs

Tableau XVIII : Zones d'inhibitions obtenues avec les différents témoins

zones d'inhibitions Souches	Zones d'inhibitions (en mm) obtenues avec les surnageants concentrés 10 fois chauffé à 80°C et à 100°C.					
	Tampon Phosphate de potassium	Acide lactique à 30%	MRS stérile	Surnageant Ln37 C×10 chauffé 5min/80°C	Surnageant Ln37 C×10 chauffé 5min/100°C	Surnageant LnAL3 C×10 chauffé 5min/100°C
<i>S.aureus 2</i>	Abs	40	Abs	20	20	20

ANNEXE IV : MILIEUX DE CULTURE

Bouillon MRS (Man Rogosa et Sharpe) (Guiraud, 2003)

Composition	Quantité g/l
Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate triammonique	2g
Sulfate de magnésium	200mg
Sulfate de manganèse	50mg
Ph final	6,5±0,02
Autoclaver à 120°C pendant 20mon	

Gélose MRS (Guiraud, 2003)

Composition	Quantité g/l
Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate triammonique	2g
Sulfate de magnésium	200mg
Sulfate de manganèse	50mg
Agar	15g
pH final	6,50±0,02
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.	

Bouillon nutritif (Guiraud, 2003)

Composition	Quantité g/l
Peptone	10g
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g
pH final	7,2±0,02
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes	

Gélose nutritif (Guiraud, 2003)

Composition	Quantité g/l
Peptone	10g
Extrait de viande	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g
pH final	7,2±0,02
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.	

Gélose EMB (milieu à l'éosine et au bleu de méthylène) (IPA)

Composition	Quantité g/l
Peptone	10g
Lactose	10g
Phosphate bipotassique	2g
Eosine	0,4g
Bleu de méthylène	65mg
Agar	15g
pH final	7,1±0,02
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.	

Gélose S-S (salmonella-shegilla) (IPA)

Composition	Quantité g/l
Peptone	10g
Extrait de viande	5g
Lactose	10g
Sels biliaires	6g
Citrate de sodium	8.5g
Citrate de fer ammoniacal	1g
Thiosulfate de sodium	8.5g
Rouge neuter	25mg
Vert brillant	0,33mg
Agar	13g
pH final	7±0,02
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.	

Gélose Chapman (Guiraud, 2003)

Composition	Quantité g/l
Extrait de viande	1g
peptone	10g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	0,025g
Agar	15g
pH final	7,4±0,02
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.	

Gélose Sabouraud (IPA)

Composition	g/l
Polypeptone	10g
Glucose anhydre	36,4g
Agar	15g
pH final	5,7±0,02
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.	

Gélose Muller Hinton (Pronadisa, 2012)

Composition	Quantité g/l
Peptone de caséine	17,5g
Infusion de viande de de bœuf	2g
Amidon	1,5g
Agar bactériologique	17g
pH final	7,4±0,02
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.	

Bouillon VRBL (Guiraud, 2003)

Composition	Quantité g/l
Peptone	10g
Extrait de viande	4g
Chlorure de sodium	5g
lactose	15g
Rouge de phénol	80mg
Vert brillant	7,5mg
pH final	7,4±0,02
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.	

Bouillon BCPL/cloche (bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol) (Guiraud, 2003)

Composition	Quantité g/l
Peptone	5g
Extrait de viande	3g
lactose	10g
Pourpre de bromocrésol	25mg
Agar	15g
pH final	7±0,02
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.	

Eau physiologique (Guiraud, 2003)

Composition	Quantité g/l
Chlorure de sodium	8,5g
Eau distillée	1l
pH final	7.2±0,02
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.	

Eau peptonée (Guiraud, 2003)

Composition	g/l
Peptone exempt d'indole	15g
Chlorure de sodium	5g
pH final	7,2±0,02
Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.	

RÉSUMÉ

Les bactéries lactiques sont connues depuis longtemps pour leur capacité de fermentation lactique associée à de nombreux aliments fermentés (yaourts, saucisson, choucroute....etc.). Elles inhibent également la prolifération des microorganismes pathogènes et d'altération par la production de bactériocines et par abaissement du pH dû à la production d'acide lactique.

Ce travail a été entrepris dans le but d'étudier *in vitro* l'activité antagoniste de deux souches de *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* (Ln37, LnA13) et d'une souche de *Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris* (Ln25) à l'égard de plusieurs souches microbiennes (neuf souches pathogènes et trois souches fongiques).

L'antibiose exprimée par ces derniers restes active à un pH de 3 à 7, au traitement avec les protéases (la pepsine) et après chauffage pendant 5 min à 100 °C. Toutefois elle est inhibée au traitement avec la trypsine, ce qui indiquerait la nature protéique de la substance antimicrobienne.

Toutes les souches utilisées (tests et cibles) dans cette étude ont montrées en général une résistance vis-à-vis de tous les antibiotiques testés.

En général les résultats obtenus dans cette étude montrent que les trois souches de *Leuconostoc mesenteroides* sont productrices de substances antibactériennes et antifongiques actives vis-à-vis de toutes les souches cibles testées avec une meilleure activité pour les deux souches de *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*.

Mots clés : *Leuconostoc mesenteroides* , antagonisme, substance antimicrobienne, flore pathogène, flore d'altération, antibiogramme.

ABSTRACT

The lactic acid bacteria have long been known for their ability to lactic fermentation associated with many fermented foods (yogurt, sausage, sauerkraut). They also inhibit the growth of pathogens and spoilage through the production of bacteriocins and by lowering the pH due the lactic acid production.

This work was undertaken in order to study *in vitro* antagonistic activity of two strains of *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* (Ln37, LnA13) and a strain of *Leuconostoc mesenteroides subsp.cremoris* (Ln25) against several bacterial strains (nine pathogenic strains and three fungal strains).

The antibiosis expressed by them remains active at a pH of 3 to 7, the treatment with protease (pepsin) and after heating for 5 min at 100 ° C. However, it is inhibited to treatment with trypsin, suggesting the protein nature of the antimicrobial substance.

All strains used (tests and targets) in this study have shown a general resistance against all the antibiotics tested.

In general the results obtained in this study show that the three strains of *Leuconostoc mesenteroides ssp.* are producing antibacterial and antifungal substances active against all targets tested strains with improved activity for both strains of *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*.

Keywords: *Leuconostoc mesenteroides* , antagonism , antimicrobial substance, pathogenic flora, spoilage flora, susceptibility.

Introduction

PARTIE
SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I
Les bactéries
lactiques

Chapitre II
Les leuconostcos

Chapitre III
Les contaminants
des denrées
alimentaires

*PARTIE
PRATIQUE*

Partie I
Matériel et
méthodes

Partie II
Résultats et
discussion

Conclusion

*Références
bibliographiques*

Annexes