

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE JIJEL



Faculté des Sciences

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mémoire

De Fin d'Études en vue de l'Obtention du Diplôme d'Ingénieur d'État
en Biologie

Option : Contrôle de Qualité et Analyses

Thème

*Recherche, isolement et
identification de leucostoc*

Membre Du Jury :

Président : Mr. Idoui Tayeb

Examineur : Mr. Boudjerda Djamel

Encadreur : Mr. Kerdoun Noureddine

Présenté par :

M^{elle} Khedimallah Nacira

M^{elle} Berkane Meriem

M^{elle} Sifouane Radia

Promotion : juillet 2007

Remerciements

Nous remercions Dieu qui nous a donné la volante d'étudier et qui nous a aidé à élaborer cet humble travail .

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance et notre gratitude pour tous ceux qui nous ont aidé et encouragé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire plus particulièrement :

Notre encadreur Mr KARDOUNE Noureddine d'avoir accepté de diriger ce travail , pour ces précieux conseils et ses encouragements , ainsi que pour sa gentillesse et sa grande patience jusqu'à la fin de ce mémoire .

Notre professeur Mr IDOUI Tayeb pour toute son aide , sa disponibilité et ses précieux conseils qui nous nous avions besoins .

Tous les enseignants de la Biologie de l'université de Jijel , tous les techniciens du laboratoire de Microbiologie de Jijel .

Enfin nous remercions les membres de Jury qui ont fait l'honneur de jurer notre travail .

Dédicace

Grâce à Dieu et par son aide j'arrive à la fin de mon parcours universitaire .

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui sont chers à moi :

A ma chère et unique personne au monde , ma mère HADDA , vous êtes le symbole de la bonté , d'affection et de sacrifice , je n'oublierai jamais ce que tu as fait pour que je suis aujourd'hui .

A mon cher père AMMAR qui m'a aidé à affronter toutes les difficultés .

" que Dieu les garde pour moi "

A mes frères Mouhammed , Abdel Hafide et Nouredine .

A mes sœurs surtout Souade , Dalila et Lokja , leur enfants ainsi que leur maris .

A tous les membres de ma famille et plus spécialement : Houda , Merieme et Chayema .

A mes amies : Dalila , Assma et Wissam .

A tous les étudiants du 5^{ème} années contrôle de qualité et analyse .

Radia

Dédicace

Au terme de ce mémoire je voudrais tous d'abord remercier mon bon Dieu miséricordieux qui m'a donné courage et force pour mener à bien ce modeste travail qui je le dédie en signe de respect et de connaissance à :

premièrement à ceux qui sont la cause de mon existence , à mes très chère parents, mon père « OMAR » et ma mère « AKILA » pour leur sacrifices durant toute leur vie , pour me guider avec brillant avenir , et qui nous a donné toujours le courage , l'amour , le soutient et qui nous ont illuminé par leurs conseils , j'espère que mon Dieu les protège et m'offre la longue vie pour lui rendre aux moins une petite partie de leur efforts .

Mes très chères sœurs : Wafa , Salîha , qu'elles ont été mon appui et mon refuge pendant toutes les difficultés de la vie , et restent avec moi aux saisons de joie et de tristesse , ainsi que ma sœur et amie Hanan et son gentil époux Youcef .

Mon frère « Ahmed » pour son aide précieux .

Mon petit frère et la fleur de la maison (noyau de la maison) « Zaki » .

Mes grand-mères « Sacia » et « Hâdjira » .

Mes tantes « Rachida , Wassila , Noura » et leur conjointes qui m' ont aidé sans limite dans les cours blancs , sans oublier leur fils et filles : « Imen , Maroua , Lakhdar , Malak , Loukman , Ahmed et l'adorable Rouzlène »

*Mes oncles et leurs épouses , leurs fils et filles notamment Mohamed , Nawel ,
Zahira , Hichem , Hamza , Houcine , Djamilia et Faycel ...*

*Mes tontons , leurs épouses , leurs fils et filles : « Soumia , Salah , Rida , Charaf
Raouf , Kheir-eddine , et Achraf » .*

*Mes compagnons dans ce travail et avec qui j'étant partage , mes amies :
« Meriem.B et Radia.S » .*

*Mes amies « Meriem , Hadda , Fifi , Amira , Amina , Dalal , Meriem.T ,
Amina.Z , Yasmina ... » .*

*Mr BELLAMRI Nadir pour l'aide qui ma procuré , en mettant ses moyens
personnels à ma disponibilité .*

*Tous ceux qui ont été saisi par l'amour de mon cœur et dont ma plume n'ont pas
leur gratitude .*

*Tous les étudiants de la promotion de contrôle de qualité et analyse – ingénieur –
2007 .*

NACIRA

Abréviations

°C : degré Celsius .

µg : microgramme .

µm : micromètre .

ADH : Arginine Di hydrolase .

ADN : Acide Désoxyribonucléique .

ADP : Adénosine DiPhosphate .

Ala : Alanine .

ARN_r : Acide Ribonucléique ribosomal .

ATB : Acid Tomato Broth .

ATP : Adénosine Tri Phosphate .

CoA : Co-enzyme A .

DO : Densité optique .

g : gramme .

H : Heure .

kg : kilogramme .

Lb : *Lactobacillus* .

Lc : *Lactococcus* .

Ln : *Leuconostoc* .

Lys : Lysine .

mg : milligramme .

Mg⁺² : ion de Magnesium .

Min : Minute .

ml : millilitre .

NAD⁺ : Nicotine Amide Dinucléotide .

NADH⁺H⁺ : Nicotine Amide Dinucléotide Hydrogéné .

NADP⁺ : Nicotine Amide Dinucléotide Phosphate .

NADPH⁺H⁺ : Nicotine Amide Dinucléotide Phosphate Hydrogéné .

nm : nanomètre .

Pc : *Pediococcus* .

pH : Potentiel d'Hydrogène .

Pi : Phosphate inorganique .

Ser : Serine .

Ssp : Subespèce .

St : *Streptococcus* .

Su : Sous unité .

TSE : Tryptone-Sel-Eau

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les différents habitats des genres des bactéries lactiques . P 04

Tableau 02 : Profils biochimiques des *Leuconostoc* (D'après De Roissart et Luquet , 1994 , modifié) . P 14

Tableau 03 : Profils biochimiques des *Leuconostoc* (D'après De Roissart et Luquet , 1994 , modifié) (suite) . P 15

Tableau 04 : Classement des principales espèces de *Leuconostoc* qui se rencontre dans les aliments. P 29

Tableau 05 : Effets indésirables de différentes doses de l'histamine sur la santé .P 32

Tableau 06 : Evolution du nombre des *Leuconostoc* dans les trois échantillons pendant 03 jours .P 48

Tableau 07 : Profils biochimiques des souches isolées . P 50

Tableau 08 : Profils fermentaires des sucres des souches isolées . P 54

Tableau 09 : Identification des souches isolées . P 55

Tableau 10 : Evolution du pH des souches isolées pendant 15 jours . P 57

Tableau 11 : Résultats de densité optique à l'absorbance à 595 nm . P 59

Tableau 12 : concentration des protéines dans les culots cellulaires . P 61

Sommaire

Introduction	01
Partie I : synthèse bibliographique	
Chapitre I : Les bactéries lactiques	02
I.1 – Généralité	02
I.2 – Origine	03
I.3 – Habitats.....	03
I.4 – Taxonomie	05
I.4. 1 – Caractères morphologiques	05
I.4.2 – Caractères physiologiques.....	05
I.4. 3 – Caractères biochimiques.....	06
I.4. 4 – Caractères nutritionnels	07
I.5 – Classification des bactéries lactiques	07
I.5.1- Genre <i>Streptococcus</i>	07
I.5.2 – Genre <i>Lactococcus</i>	08
I.5.3- Genre <i>Lactobacillus</i>	09
I.5.4- Genre <i>Pediococcus</i>	09
I.5.5-Genre <i>Leuconostoc</i>	10
I.6- Métabolisme fermentaire des bactéries lactiques.....	10
Chapitre II : Le genre <i>Leuconostoc</i>	12
II.1 – Définition et habitat	12
II.2 - Taxonomie	12
II.2.1 – Les caractères morphologiques	12
II.2.2 – Les caractères physiologiques	12

II.2.3 - Les caractères biochimiques	13
II.3- Classification	16
II.4 – Métabolisme fermentaire de <i>Leuconostoc</i>	17
II.4.1- Métabolisme du citrate	17
II.4.2- Production de l'acide lactique	18
II.4.3- La production des polysaccharides « dextrane »	20
II.5 – Enrichissement , isolement et milieux de culture de <i>Leuconostoc</i>	22
Chapitre III : Les aptitudes technologiques des bactéries lactiques	24
III.1- Rôle sur la structure et la texture	24
III.2- Rôle sur les caractéristiques organoleptiques	24
III.3- Rôle sur la conservation	25
III.3.1- Causes principales	26
➤ Production d'acide organique	26
➤ Production de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	26
➤ Production de bactériocines	26
III.3.2- Causes annexes	27
➤ Production du gaz carbonique	27
➤ Production de diacétyl et d'acétaldéhyde	28
Chapitre IV : Les risques alimentaires causés par <i>Leuconostoc</i>	30
IV.1 – problèmes liés à la production de polysaccharides	30
IV.2 – problèmes liés à la production d'acide lactique et d'autres dérivés organiques	30
IV.3 – problèmes liés à la production du gaz	31
IV.4 – Problèmes liés à la production des amines biogènes	31
Partie II : Travail pratique	
II- Matériel et méthodes.....	34
II.1- Matériel.....	34
II.1-1- Matériel biologique.....	34
II.1.1.1- Les substrats	34
II.1.1.2- L'eau distillée stérile.....	35

II.1.1.3- Les antibiotiques.....	35
II.1.2- Milieux de culture	35
II.1.3 - Autres réactifs	36
II.1.4 – L'appareillage	36
II.2 – Méthodes	37
II.2.1 – La recherche et l'identification des <i>Leuconostoc</i>	37
II.2.1.1 – Préparation des solutions mères et des dilutions décimales	37
➤ Les substrats solides	37
➤ Les substrats liquides (Lben)	37
II.2.1.2 – Recherche et isolement des <i>Leuconostoc</i>	38
II.2.1.3 – Dénombrement des <i>Leuconostoc</i>	41
II.2.1.4 – Identification	41
II.2.1.4.1 – Examen macroscopique	41
II.2.1.4.2 – Examen microscopique	41
II.2.1.4.3 – Tests physiologiques et biochimiques	42
II.2.1.4.3.1 -- Recherche de la catalase	42
II.2.1.4.3.2 – Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)	43
II.2.1.4.3.3 – Production de dextrane	43
II.2.1.4.3.4 – Production d'acétoïne	43
II. 2.1.4.3.5 – Recherche de la citratase	44
II.2.1.4.3.6 – Recherche de type fermentaire	44
II.2.1.4.4 – Le profil fermentaire	44
II.2.2 – L'étude de quelques mesures de croissance	45
II.2.2.1 – Détermination du pH	45
II.2.2.2 – Dosage des protéines	45
➤ Principe	45
➤ Mode opératoire	46

III- Résultats et discussion	47
III.1- Isolement , dénombrement et identification des souches	47
III.1.1- Examen macroscopique	47
III.1.2 – Dénombrement	47
III.1.3 – Examen microscopique	49
III.1.4 – Les tests physiologiques et biochimiques	50
III.1.5- Identification par profil de fermentation des sucres	53
III.2 – Quelques mesures de croissance du <i>Leuconostoc</i>	56
III.2.1 – Evolution du pH	56
III.2.2- Dosage des protéines	59
Conclusion	64
Références bibliographiques	66
Annexe 01	71
Annexe 02	72

Introduction

Introduction

Les produits alimentaires contiennent généralement des microorganismes , certains sont indispensables car ils participent à la transformation et la conservation des aliments et assurent le développement des qualités organoleptiques particulières .

Les bactéries qui en responsables sont toutes groupées sous la même appellation de bactéries lactiques .

Le genre *Leuconostoc* fait partie des bactéries lactiques acidifiantes chimiohétérotrophes qui jouent un rôle important dans l'industrie agroalimentaire , mais à partir de 1990 , ce germe commence à présenter des danger pour la santé humaine : méningite purulente , péritonite , abcès de l'abdomen , des infections nosocomiales du tractus urinaire et d'autres infections odontologiques .

Certains risques peuvent aller jusqu'aux allergies suites à la libération des amines de type histamine , tyramine , diamino-butane et la diamino-pentane .

Et pour cela , nous avons jugé intéressant de travailler sur ce genre de bactéries pour mieux comprendre la gamme des produits alimentaires ciblés par cette bactéries et l'évolution de leur métabolites pendant leur croissance .

Ce présent travail est divisé en deux parties , l'une bibliographique et l'autre pratique .

Dans la première partie , on a fait le point de connaissance sur les bactéries lactiques , puis sur le *Leuconostoc* , leurs aptitudes technologiques et les risques alimentaires causés par ce germe .

Dans la deuxième partie , nous avons assigné de réaliser un travail qui comporte les étapes suivantes :

- Isolement , dénombrement et identification des souches de *Leuconostoc* à partir du lben , olives et viandes emballées sous vide .

- Etude de quelques mesures de croissance (variation du pH , dosage des polysaccharides et le dosage des protéines) .

Partie I

Synthèse

Bibliographique

Chapitre 1

les bactéries

lactiques

I.1 – Généralité

Les bactéries lactiques sont des germes décrits pour la première fois par **Orla – Jensen** au début du 19^{ème} siècle (1919), et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacités à fermenter les glucides, en produisant de l'acide lactique D (-), L (+).

La fermentation est dite homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé (Voie d'Embden Meyerhof Parnas), et hétérofermentaire si d'autres composés sont aussi présents : acide lactique, éthanol, CO₂, ... (Voie de Dickens – Horeker et d'Entner – Deudoroff) [38].



Fig. 01: Différents isomères de l'acide lactique [37].

Parmi les données rapportés par la bibliographie, on cite ce qui suit :

- Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes Procaryotes, hétérotrophes - chimioorganotrophes, asporogènes et immobiles [15].
- Ce sont des bactéries Gram (+), oxydase et catalase (-), généralement nitrate réductase négative [42].
- Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérotrophe qui n'est pas clairement défini de point de vue taxonomique.
- Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres de bactéries à Gram positif possédant des caractéristiques physiologiques et métaboliques communes [48].
- Elles sont très exigeantes pour les nourritures : azote et vitamines [1].

Chapitre I : Les bactéries lactiques

- Elles sont dépourvues de cytochromes , étant incapables de respirer mais peuvent seulement effectuer un métabolisme fermentaire [37] .

I.2 - Origine

Les bactéries lactiques se trouvent généralement associées à d'autres microorganismes dans de nombreux produits d'origine animale et végétale fermentés : fromage , beurre , viande fermentée (saucisson ...), boissons alcoolisées à base de fruits (cidre , bière ...), légumes et fruits fermentés [15] .

Les espèces de genres *Streptococcus* , *Lactococcus* ou *Leuconostoc* se rencontrent plutôt chez les hommes , les animaux et les oiseaux , on peut les isoler de la peau des animaux , des matières fécales et les poussières , mais aussi de l'ensilage du foin et des grains [35] .

I.3 – Habitats

Les bactéries lactiques ont un habitat adapté et restreint [32] .

Les unes font partie de la flore normale du corps humains :

- Rhinopharynges (*Streptococcus*) .
- Intestinales (*Streptococcus*, *Lactobacillus*) .
- Vaginales (*Lactobacillus*) .

D'autres résident abondamment dans le lait (Streptocoques lactiques , *Lactobacillus*) , d'autres encore hôtes constants de certains végétaux qui sont retrouvés dans un grand nombre de produits alimentaires ou de boissons , saumures , choucroutes , saucissons crus , salaisons , bière , vin , jus de fruits (*Leuconostoc*) ...

Les bactéries lactiques sont généralement des germes fragiles parasites des muqueuses .

Tableau 01 : Les différents habitats des genres des bactéries lactiques [49] .

<i>Streptococcus.aerococcus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Très généralement parasite des muqueuses, en particulier buccale, digestive et rhinopharyngée . - Saprophytes du lait et des produits laitiers .
<i>Enterococcus</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Commensal de la flore intestinale . - Parasites des muqueuses digestives , environnement .
<i>Lactococcus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Commensal des muqueuses de mamelles . - Saprophytes du lait et des produits laitiers . - Les <i>Lactococcus</i> sont utilisées comme bactéries lactiques dans la fabrication du yaourt , alors que les bactéries réglementaires de ce produit sont <i>Streptococcus.thermophilus</i> et <i>Lactobacillus.bulgaricus</i> .
<i>Leuconostoc.pediococcus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Commensaux du tube digestif . - Saprophytes des végétaux - Utilisées dans la fabrication de divers aliments comme le cheddar, la choucroute , le saucisson .

I.4 – Taxonomie

I.4.1 – Caractères morphologiques

Selon les caractères morphologiques des bactéries lactiques , il existe deux types : les cocci et les bacilles [24] .

- **Les cocci**

Ce sont des petites sphères plus ou moins ovoïdes de 0,5 à 1,5 μm de diamètres dont la division peut engendrer des paires , des tétrades et des chaînes [24] .

- **Les bacilles**

Ce sont des petites bâtonnets plus ou moins allongés , ont des formes longues de 0,5 à 1,5 μm de diamètre et 1,5 à environ 10 μm de long , se présentent en paire ou en chaînettes de longueur variable [39] .

On distingue 5 genres principaux en forme de coque: *Lactococcus* , *Streptococcus* , *Pediococcus* , *Leuconostoc* et *Enterococcus* ; et 2 genres en forme de bacilles : *Lactobacillus* , *Carnobacterium* .

- ***Streptococcus*** : homolactique (homofermentaire) , la division cellulaire donne des sphères , ovoïdes , groupés en chaînettes .
- ***Leuconostoc*** : hétérolactique (produite du CO_2) , des cellules de formes lenticulaires groupées en paires ou en chaînettes courtes .
- ***Pediococcus*** : homolactique , leur division cellulaire donne des sphères groupées en paires ou en tétrades .
- ***Lactobacillus*** : homo ou hétérolactiques , les cellules sont des bâtonnets plus ou moins allongés , groupées en paires ou en chaînettes, qui sont quelque fois disposées en spirales [14, 39] .

I.4.2 – Caractères physiologiques

Le caractère physiologique permet de différencier les espèces entre elles ,

les tests les plus couramment appliqués sont [15] :

- L'aptitude de fermenter les sucres .
- La recherche de réductase et d'arginine dihydrolase.
- La température de croissance , car elles ont la possibilité de se multiplier à température relativement basse (10°C ou 15°C) , ou relativement haute 45° [20] .
- La thermorésistance à 60°C (survie après une durée de chauffage de 30 min du plus) est également intéressante à connaître de rares espèces qui résistent dans les conditions de la pasteurisation basse (36 / 30 min) [20] .
- L'inhibition par le chlorure de sodium à des concentrations allant jusqu'à 6,5 % est un caractère important [20] .

Ainsi que d'autres tests d'identification tel que [15] :

- L'hydrolase de l'amidon , la production de l'acétoïne et de dextrine , le besoin en vitamine et la culture sur teepol .
- La croissance a pH = 9,6 et dans le lait au bleu de méthylène , liquifaction du gélatine , culture sur le lait tournesol et l'hydrolyse de l'esculine .

I.4.3 – Caractères biochimiques

Les principales caractéristiques se résument en : [02]

- La production de gaz carbonique (fermentation gazogène des sucres) , permet de distinguer les espèces hétérofermentaires .
- L'activité protéolytique , comme les caséines , est limitée chez les bactéries lactiques .
- La fermentation des hydrates de carbone est l'un des plus importants critères de classification , et l'activité réductrice est un caractère pour les *Streptococcus* (faiblement mise en évidence dans le lait tournesolé) .

I.4. 4 – Caractères nutritionnels

Les bactéries lactiques sont considérées comme un grand groupe bactérien des plus exigeants du point de vue nutritionnel , parce qu'elles requièrent non seulement des substrats complexes : carbonés , azotés , phosphatés et soufrés ,mais aussi des facteurs de croissance , tel que les vitamines et les oligoéléments [15] .

I.5 – Classification des bactéries lactiques

D'après Surta *et al.* [33] , la classification des bactéries lactiques vient d'être revue et simplifiée , compte tenu des apports modernes de la taxonomie moléculaire qui est basée sur le séquençage de l'ARN_r (ARN ribosomal) .

Les bactéries lactiques sont représentées par cinq principaux genres d'importance différente : [35]

- *Streptococcus* .
- *Lactococcus* .
- *Lactobacillus* .
- *Pediococcus* .
- *Leuconostoc* .

De récentes études taxonomiques ont également conduit à différencier des nouveaux genres comme : *Vagococcus* , *Oenococcus* et *Tetragenococcus* [48] .

Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques , mais leur usage dépend de l'industrie laitière .

I.5.1- Genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* comprend la majorité des espèces de streptocoques [38].

Les cellules de ses espèces ont une forme ronde et elles sont assemblées par deux ou en chaînes , très exigeants du point de vue nutritionnel [22] .

Leur reproduction s'effectue parallèlement à un seul plan , ce qui conduit à des associations des cellules par paires (diplocoques) , en chaînes et en chaînes de cellules par paires (streptocoques) [37] .

Les techniques d'investigation de la biologie cellulaire ouvrent la voie à une taxonomie plus rigoureuse , ces techniques ont trouvées une application dans la sélection des souches à hautes performances technologiques [39] .

Le pourcentage en G et C de l'ADN de *Streptococcus* est entre 34 % et 36 % [38] .

La plupart des espèces (initialement) sont thermophiles , leur fermentation est homolactique [48] . Les espèces initialement regroupées dans le genre *Streptococcus* ont été redistribuées dans ces quatre genres selon les homologues de leur ARN ribosomique 16S⁴⁰ [48] .

La classification de **Bergey** fait apparaître 29 espèces principales .

I.5.2 – Genre *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* (streptocoques de groupe N) représente les streptocoques dites « lactiques » , car ils sont associés à de nombreux fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène , largement présent dans le lait et les produits laitiers .

Ce sont des cellules sphériques , mésophiles , peuvent quelques fois s'allonger, elles produisent l'acide lactique L (+) [38] .

Certaines espèces isolées de poissons et d'eau douce possèdent la particularité d'être mobiles [48] .

- La dégradation des monosaccharides par des voies métaboliques différents .

Selon l'espèce bactérienne , on distingue : la voie homofermentaire et hétérofermentaire [43] :

- **La voie homofermentaire** : le lactose est transformé en acide lactique principalement .
- **La voie hétérofermentaire** : le lactose est transformé en acide acétique , éthanol et CO₂ , en plus de l'acide lactique .

Les bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène , mais de trop grandes teneurs peuvent leur être néfastes , ceci peut probablement être relié au peroxyde d'oxygène (H₂O₂) qui est produit dans les cellules en présence d'air .

Le H₂O₂ doit être éliminé , si non son accumulation devient toxique . Le système le plus efficace d'élimination du H₂O₂ est une enzyme nommée « catalase » , dont les bactéries lactiques sont déficientes . Les bactéries lactiques possèdent plutôt une « peroxydase » , moins efficace que la catalase . Ainsi , comme les bactéries lactiques n'éliminent pas facilement la peroxyde , elles sont considérées comme microaérophiles [53] .

Chapitre 11

le genre

Leuconostoc

II.1 – Définition et habitat

Appartenant à la famille de Streptococaceae , les *Leuconostoc* sont des bactéries qui ont été isolées d'herbage et d'ensilage du vin et de grappe de raisin , des produits laitiers et fromagers , des fruits et des légumes en particulier du betterave d'où leur ancien nom *Betacoccus arabinosus* (**Karstom** 1931 – 1937) , les végétaux en fermentation par exemple la choucroute (**Fleming et al.** 1985) et les produits de panification (**Sugihara** , 1985) .

Leuconostoc mesenteroides a été isolée en particulier à partir des pâtes fermentées [05,25] .

II.2 - Taxonomie

Les bactéries lactiques forment un groupe très hétérogène , cette hétérogénéité s'explique par une diversité morphologique , physiologique et biochimique [3,17] .

II.2.1 – Les caractères morphologiques

Les cellules de *Leuconostoc* sont sphériques et souvent lenticulaires , ce qui rend difficile la différenciation par rapport au *Lactobacillus* hétérofermentaire .

Les cellules font de 0.5 à 0.7 μm sur 0.7 à 1.2 μm , le plus souvent par groupe de deux , rarement en chaînettes [06] .

Ces bactéries sont Gram (+) , asporulées , immobiles et encapsulées , cette propriété entraîne fréquemment l'apparition d'une viscosité dans le milieu [06] .

II.2.2 – Les caractères physiologiques

Le genre *Leuconostoc* a une physiologie semblable à celle du genre *Lactobacillus* , *Pediococcus* et les autres bactéries phynotypiques [54] .

Ils sont mésophiles, se développent entre 20°C et 30°C mais pas à 45°C . Ils sont anaérobies facultatifs et exigeants sur le plan nutritionnel vis-à-vis des vitamines et des acides aminés .

Leur pourcentage en base G et C (GC%) de l'ADN est comprise entre 36 – 43 % [13,22,31,38] .

II.2.3 – Les caractères biochimiques

Ils possèdent un caractère hétérofermentaire marqué par la production de l'acide lactique (isomère D) , du CO₂ et d'éthanol .

Certaines espèces sont capables de fermenter le citrate , ce qui leur confère une activité aromatique importante .

Ils ne sont pas pathogènes . Ce sont des contaminants fréquents , qui produisent des accidents de fabrication dans les produits acides , sucrés et dans les végétaux [48] .

Tableau 02 : Profils biochimiques des *Leuconostoc* (D'après De Roissart et Luquet , 1994 , modifié) [30] .

espèces	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13
G+C	40-42	40	39	38-40	40		43-45	38-40	37-40	37-41	37-40	37-40	38-41
Type de murène	Lys-Ala ₂				Lys-Ala ₂		Lys-Ala ₂	Lys-Ser-Ala ₂	Lys-Ser-Ala ₂	Lys-Ser-Ala ₂	Lys-Ser-Ala ₂	Lys-Ala ₂	
Isomère d'acide lactique	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)		D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)
Citrate	•	•	-	•	•	-	±	±	±	±	±	•	•
Pigmentation jaune	-		-	+		-	-			-	-		-
NaCl 3%	-		+	-		+	±	-	±	+	-	±	-
NaCl 6.5%	•	•	•	•		•	-	-	-	±	-	±	•
pH 4.8	-	•	•	+			-	-	-	-	+	±	•
pH 6.5	•		•	•		+	+	+	+	+	±	+	•
< 5°C	+	•	+	•	•	+	•	•	•	•	•	•	•
15°C	+	+		+	+		-	+	+	+			+
30°C				+				+			±	+	
37°C		+	-	±	+	-	+	-	+	±		±	+
45°C	-			-	-		-			-			
Ethanol 10%							-	-	-	-	+		
Gaz à partir du glucose	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
β-galactosidase						+							

Tableau 03 : Profils biochimiques des *Leuconostoc* (D'après De Roissart et Luquet , 1994 , modifié) (suite) [30] .

espèces	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13
Amygdaline		-	-	+	-	-	-	-	±	±		±	-
L-arabinose	+	±	-	+	-	-	-	-	-	+	±	±	+
Arbutine		-	-	+	-	-	-	-	-	±		-	-
Cellobiose	+	±	±	+	-	±	-	-	±	±	±	±	+
Esculine				+									+
D-fructose	+	±	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Galactose		+	-	-	-	-	+	±	±	+	±	+	+
Lactose	-	+	-	-	-	-	+	+	+	±	-	±	+
Maltose	+	+	±	+	+	±	+	±	+	+	-	+	+
Mannitol	+	±	-	+	±	-	-	-	±	±	-	±	-
D-mannose		+	±	+	+	±	±	-	±	+	±	+	+
Mélibiose		+	±	-	-	±	±	-	±	±	±	+	+
α-méthyl-D-glucoside		±	+	+	+	+							+
Raffinose	-	+	-	-	-	-	±	-	±	±	-	±	+
Ribose	-	-	±	-	+	±				+			+
Salicine	+	-	±	+	-	±	±	-	±	±	±	-	±
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Tréhalose	+	±	+	+	±	+	-	-	+	+	+	+	+
D-xylose	-	±	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	+

Espèces :

01 : *Ln.amelibiosum* .

02 : *Ln.argentinum* .

03 : *Ln.carnosum* .

04 : *Ln.citreum* .

05 : *Ln.fallax* .

06 : *Ln.gelidum* .

07 : *Ln.lactis* .

08 : *Ln.mesenteroides* ssp *cremoris* .

09 : *Ln.mesenteroides* ssp *dextranicum* .

10 : *Ln.mesenteroides* ssp *mesenteroides*.

11 : *Ln.oenos*.

12 : *Ln.paramesenteroides*.

13 : *Ln.pseudomesenteroides*.

II.3- Classification

Les espèces de *Leuconostoc* sont différenciées à d'autres bactéries lactiques sur la base de critères phynotypiques tel qu'apparence du cocci , formation du gaz , incapacité d'hydrolyser l'arginine et production du lactate D(-) isomère du glucose .

Mais la formation du dextrane de saccharose et la composition du mur de la cellule être aussi utilisable pour l'identification [54] .

La liste d'espèces de *Leuconostoc* qui présente dans le manuel de **Bergey** de bactériologie systématique comprend seulement 4 espèces : [54]

➤ *Leuconostoc mesenteroides* : qui est divisée selon la classification de **Bergey** en trois sous-espèces : [37]

* *Ln.mesenteroides ssp mesenteroides*.

* *Ln.mesenteroides ssp dextranicum* .

* *Ln.mesenteroides ssp cremoris* .

➤ *Leuconostoc paramesenteroides*

➤ *Leuconostoc lactis*

➤ *Leuconostoc oenos* [35,38] .

Leuconostoc oenos a été classé dans un nouveau genre *Oenococcus oeni* cité par Corgan 1996 [19] .

Cependant en 1989 cinq nouvelles espèces de *Leuconostoc* sont décrites : [54]

* *Leuconostoc amelibiosum*.

* *Leuconostoc carnosum*.

* *Leuconostoc citreum*.

* *Leuconostoc gelidium*.

* *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

Ainsi qu'un nouveau genre, *Weissella* qui ressemble *Ln. paramesenteroides* et plusieurs *Lactobacillus* hétérofermentaires (*Lb.confusus*, *Lb.viridescens*, *Lb.halotolerances*) dénomination précédente [3].

Avec le glucose 6-phosphate déhydrogénase comme protéine de référence, il est possible de démontrer que les *Leuconostoc* se répartissent en six groupes distincts correspondant aux groupes d'homologie de l'ADN : [47]

* *Ln.lactis* .

* *Ln.paramesenteroides* .

* *Ln.oenos* .

* *Ln.cremoris* .

* *Ln.dextranicum* .

* *Ln.mesenteroides* .

II.4 – Métabolisme fermentaire de *Leuconostoc*

II.4.1- Métabolisme du citrate

Leuconostoc utilise peu le citrate si un stimulateur de croissance, tel que l'extrait de levure n'est pas présent. Mais en présence du glucose, il est rapidement métabolisé par les souches de *Leuconostoc* N_CW₈, S₃ et X₂, le cométabolisme donne une stimulation de la croissance, diminue l'absorption du glucose et augmente la production d'acétate et de D-lactate.

Chez *Leuconostoc*, la production de diacétyle commence avec l'entrée des cellules en phase stationnaire à pH acide (optimum pH = 4.3) et la production d'acétoïne qui est aussi supérieure à celle de diacétyle.

Dans la fermentation mixte des souches acidifiants de *Leuconostoc*, l'utilisation du citrate et la production de diacétyle et d'acétoïne dépendent de la souche aromatisante choisie.

D'autres *Leuconostoc* : *Ln.mesenteroides* ssp *mesenteroides* et ssp *dextranicum* utilisent le citrate, mais ne produisant ni l'acétoïne ni le diacétyle. La voie

métabolique est inconnue [29,38] .

II.4.2- Production de l'acide lactique

Les *Leuconostoc* sont hétérofermentaires , les souches ne possèdent pas la fructose 1-6 diphosphate aldolase , à partir du galactose qui est transformé en glucose 6-phosphate en empruntant la voie de Leloir qui sera dégradé en CO₂ et en acétate , ou à l'éthanol par la voie des pentoses phosphates , et en lactate par la voie des hexoses phosphates .

Chaque mole de lactate produit ainsi 2 mole de lactate , 2 mole du CO₂ et 2 mole d'éthanol ou d'acétate [15] .

Les *Leuconostoc* n'ont pas de catalase , ni de cytochrome et réalisent la fermentation hétérolactique en convertissant le glucose en D-lactate et en éthanol , ou en acide lactique par voie de la transacétolase [31] .

II.4.3- La production des polysaccharides « dextrane »

Le dextrane est produit par voie fermentaire des souches de *Ln.mesenteroides* dans un milieu riche en saccharose .

Les cellules en croissance secrètent l'enzyme dextrane sucrase, cette dernière est une enzyme extracellulaire [4] .

Le dextrane sucrase étant une glucosyle transférase convertie le saccharose en fructose et en glucose , le dextrane contient 95 % de liaison α (1-6) , et 50 % de liaison α (1-3) [46] .

Le saccharose phosphorylase a une action sur les résidus de glucose et le fructose libéré par le saccharose , ce dernier est phosphorylé en G-6-phosphate par le saccharase phosphorylase , puis en CO₂ et en ribulose 5-phosphate [32] .

L'isomérisation du ribulose 5-phosphate va donné des xylulose 5-phosphate , qui va être clivé en acétyle phosphate et en glycéraldéhyde 3-phosphate , le triose phosphate conduit au lactate (l'acide lactique) par le mécanisme enzymatique de la voie d'Embden-Meyrhoff , en ce qui concerne l'acétyle phosphate , une partie va être réduite en éthanol qui est un des produits constant et majeur de la fermentation des sucres , le restant donne naissance à l'acétate libre [5] .

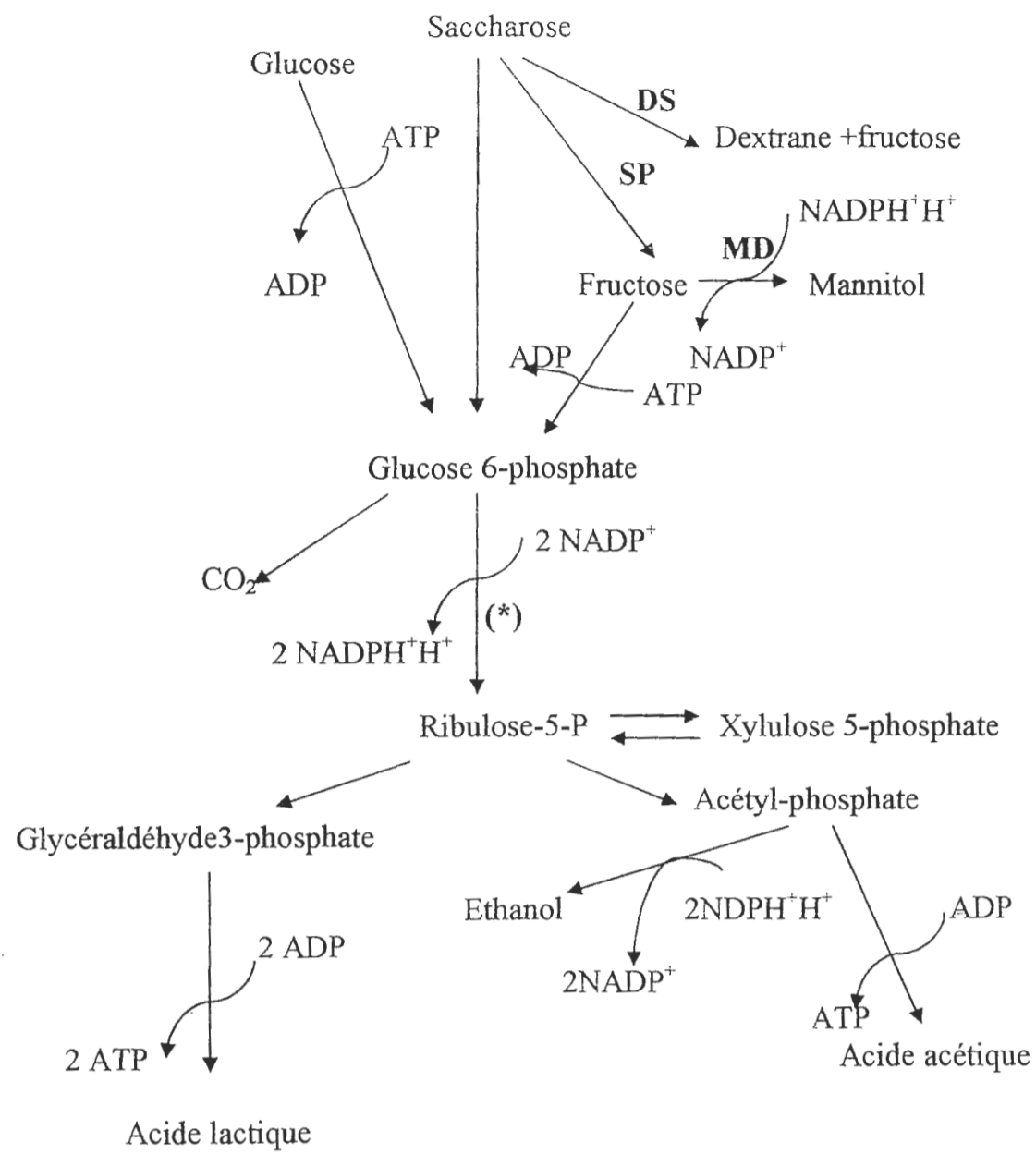
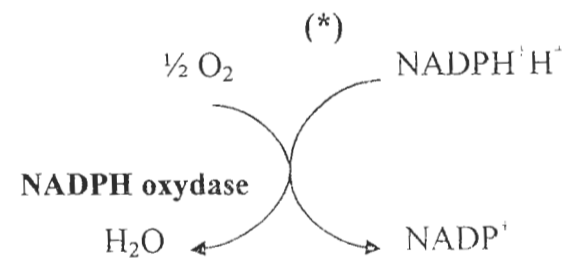


Fig.03 : Schéma métabolique de la consommation du saccharose par le système enzymatique de *Ln. mesenteroides* [46] .

DS : dextrane sucrase .
 SP : saccharose phosphorylase .
 MD : mannitol déshydrogénase .



II.5 – Enrichissement , isolement et milieux de culture de *Leuconostoc*

La connaissance de la physiologie et les conditions typiques de l'environnement qui favorisent la prolifération des souches spécifiques sont très nécessaire pour l'isolement prospéré d'espèce *Leuconostoc* [54] .

Généralement les caractères physiologiques de la plus part de *Leuconostoc* sont comparables avec celles des *Lactobacillus* , *Pediococcus* , et autre bactéries lactiques , ces aspects expliquent la difficulté d'obtenir des cultures pures de *Leuconostoc* dans une première étape de sélection [54] .

Les milieux de base pour la culture des *Leuconostoc* sont : le **milieu au jus de tomate** ou le **milieu de Garvie** .

L'isolement sur milieu solide s'effectue généralement à l'aide de **gélose au jus de tomate** en boîte de Pétri , mais on peut utiliser aussi les **géloses APT** et à l'**extrait d'orange** . L'incubation est réalisée à 30°C .

Les *Leuconostoc* peuvent être sélectionnés à partir d'un levain contenant aussi des Streptocoques lactiques , par utilisation de la **gélose au jus de tomate** contenant 0.15 mg /ml de Tétracycline qui est inhibiteur pour les seuls *Lactococcus* . Les boîtes sont incubées durant 48 heures à 30°C [22] .

Deux souches : *Ln.mesenteroides ssp mesenteroides* et *Ln.mesenteroides ssp dextranum* ont la faculté de produire à partir du saccharose une capsule polysaccharidique épaisse (slime) . Cette propriété peut être mise à profit pour détecter et dénombrer les germes responsables dans les produits alimentaires , et en particulier le sucre . On peut utiliser pour cela la **gélose hypersaccharosée** [6] .

Le milieu gélosé de Mayeux (**milieu de Mayeux – Sandine – Elliker**) est fréquemment utilisé pour l'isolement des *Leuconostoc* en laiterie et fromagerie .

A partir d'ensilage ou de végétaux fermentés , les *Leuconostoc* sont souvent isolées sur gélose **MRS** à pH 5.7 [22] .

Ln.oenos est recherchée et isolée sur un milieu spécial : **ATB** [22] .

Chapitre III

les aptitudes technologiques

des

bactéries lactiques

La fabrication où interviennent des actions microbiennes nécessite une microflore spécifique souvent complexe , la plus part des produits obtenus par fermentation résultent de procédés traditionnels dont l'objectif initial était la conservation ou la valorisation des matières premières .

La participation de la flore lactique aux caractéristiques organoleptiques , nutritionnelles et sanitaires de ces produits s'exerce par différentes propriétés métaboliques [48,49] .

III.1- Rôle sur la structure et la texture

Dans les laits fermentés , l'acidification provoque la formation d'un caillé +/- ferme selon les bactéries présentes . Selon les produits , la texture recherchée est ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé , lait ribot , kéfir) [48] .

Pour obtenir une consistance déterminée , l'utilisation de souches +/- acidifiantes peut être combinée à celle de souches productrices de polysaccharides [48].

Les levains mésophiles constitués de *Lactococcus* et *Leuconostoc* participent à la fabrication des fromages frais , fromages à pâte mole , persillés ou pressés comme le bleu où ils facilitent l'ouverture par la production de CO₂ [22] .

III.2- Rôle sur les caractéristiques organoleptiques

Dans la plus part des denrées alimentaires où elles interviennent , les bactéries lactiques participent ou sont responsables des caractéristiques organoleptiques finales des produits , en dehors de l'acide lactique et des autres acides organiques produits par fermentation qui confèrent aux produits leur caractère acide .

Les principaux composés impliqués sont les diacétyl et l'acétaldéhyde , responsables notamment des saveurs caractéristiques du beurre et du yaourt , ils sont

produits à partir du pyruvate issu de la glycolyse , mais aussi du métabolisme du citrate et de leur dégradation de certains acides aminés .

Un grand nombre de composés issus de la protéolyse des activités lipolytiques et estérasiques participent à la formation d'arômes lors de l'affinage des fromages , la flore lactique participerait également à la flaveur des saucissons par son activité lipolytique .

En vinification , la fermentation malolactique est recherchée dans certains cas pour éliminer l'acide malique qui lui confère des qualités organoleptiques désagréables.

Dans les levains de panification , le rôle des bactéries lactiques est essentiellement aromatique , par production d'acides organiques qui confèrent au pain au levain son goût particulier , tel que les souches de *Leuconostoc* qui sont retrouvés dans tous les types de fromages [48] .

Certaines espèces de ce genre comme *Ln.lactis* et *Ln.cremoris* peuvent utilisées le citrate du lait , et produisent du diacétyl qui est un élément principale de la flaveur du beurre et d'autres produits laitiers [30] .

III.3- Rôle sur la conservation

Il est à l'origine du développement de la plupart des produits fermentés , dont l'une des principales caractéristiques est de pouvoir stabiliser - sous forme d'un produit différent - une matière première , qu'il était impossible de conserver plus de quelque jours , ce rôle est liés aux propriétés d'inhibition des bactéries lactiques [48] .

L'action bactéricide ou bactériostatique des bactéries lactiques , autrement dit leur pouvoir inhibiteur , provient de différentes causes : [14]

III.3.1- Causes principales

➤ **Production d'acide organique** : essentiellement l'acide lactique, la production importante de l'acide lactique conduisant à une acidification rapide et durable , le pH final atteint dépend de la matière fermentée et les souches utilisées (+/- acidifiantes) , il est le plus souvent inférieur aux valeurs limites du développement de la plus part des flores d'altération et des flores pathogènes . L'acide acétique produit par les *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* facilite leur implantation au début de la fermentation qui aboutie à la choucroute , parce qu'il contrecarre le développement de bactéries rivales . Ainsi que les *Ln.citrovorum* inhibent les bactéries psychrotrophes d'altération du fromage frais par la production de l'acide acétique [14,48] .

➤ **Production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)** : en présence d'oxygène , et sous l'action d'enzymes , de nombreuses bactéries lactiques produisent du H₂O₂ , particulièrement les *Lactococcus lactis ssp lactis* , *Streptococcus thermophilus* et des *Leuconostoc* .

Les bactéries lactiques étant presque toujours dépourvues de catalase , le peroxyde d'hydrogène produit s'accumule dans le milieu et à partir d'un certain niveau peut exercer une action antimicrobienne : [14]

- Sur la bactérie elle même .
- Sur d'autre bactéries lactiques .
- Sur des bactéries non lactiques .

➤ **Production de bactériocines** : ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactiques , ils sont généralement thermorésistants , actifs uniquement sur des bactéries lactiques Gram (+)

Le genre *Leuconostoc* produit différents bactériocines, varie avec la variation des espèces et des souches, comme :

- La leuconocine S (Lewus et al. 1992 b) : produite par *Ln.paramesenteroides* OX, et inhibe des souches de *Clostridium botulinum*, *Lesteria.monocytogènes*, *Staphylococcus.aureus* et même selon Lewus et al., les bactéries Gram (-) qui sont *Aeromonas hydrophila* et *Yersinia enterocolitica*.
- La mesenterocine Y 105 (Hechard et al. 1992) : produite par *Ln.mesenteroides* ssp *meseteroides* Y105, et son spectre d'action est limité à des *Listeria* et elle n'agit pas sur des bactéries lactiques [14,48].

III.3.2- Causes annexes

- **Production du gaz carbonique** : il est produit dans le processus de fermentation des hexoses et du lactose par des bactéries lactiques hétérofermentaires.

Le CO₂ qui est produit à l'intérieur d'un emballage est susceptible d'inhiber le développement de certains microorganismes, grâce à trois mécanismes qui peuvent jouer conjointement :

- En se substituant partiellement ou totalement à l'air ou à l'O₂, il réduit ou supprime la croissance de la flore aérobie stricte, ralentit celle de la flore aero-anaérobie facultative, mais il est capable de stimuler celle des bactéries anaérobies strictes.
- Il abaisse le pH.
- Il exerce une action bactériostatique spécifique sur divers microorganismes [14].

Le dioxyde de carbone produit par *Leuconostoc* remplace l'air et crée un atmosphère anaérobie favorable de la stabilisation d'acide ascorbique et pour la conservation de la saveur naturelle du légume (Pederson , 1930) [54] .

- **Production de diacétyl et d'acétaldéhyde :** le diacétyl (2,3 – butanédione) est métabolisé à partir du citrate ou du pyruvate , par des bactéries lactiques telles que *Lactococcus lactis ssp diacetylactis* et des *Leuconostoc* , il possède une activité antimicrobienne qui est plus grande à l'égard des bactéries Gram (-) , des moisissures et des levures , qu'à l'égard des bactéries Gram (+) .

L'acétaldéhyde ($\text{CH}_3 \text{CHO}$) est produit au cours du métabolisme des glucides par les bactéries lactiques hétérofermentaires , il inhibe certains pathogènes : *E.coli* , *Salmonella typhimurium* , *Staphylococcus aureus* [14] .

Tableau 04 : Classement des principales espèces de *Leuconostoc* qui se rencontre dans les aliments [14] .

Espèces	Produits carnés (saucissons, viandes sous vide)	Produits laitiers (lait cru , laits fermentés, fromages)	Légumes fermentés, olives .	Poissons sous vide ou fermentés.	Levains de panification.	Vins , bières, cidres .
01		×	×		×	
02		×				
03		×	×			
04		×				
05						×
06	×					
07	×					

Souches :

01 : *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* .

02 : *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris* .

03 : *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranum* .

04 : *Leuconostoc lactis* .

05 : *Leuconostoc oenos* .

06 : *Leuconostoc carnosum* .

07 : *Leuconostoc gelidum* .

Chapitre IV

Les risques alimentaires

causés par Leuconostoc

Dans toutes les denrées alimentaires où la flore lactique est présente, son activité métabolique peut également se manifester par des effets négatifs sur la qualité des aliments du fait des altérations provoquées par la production des métabolites [48].

IV.1 – problèmes liés à la production de polysaccharides

Certaines bactéries lactiques, notamment les *Leuconostoc* et certains *Lactobacillus*, produisent des polysaccharides, ils sont responsables de la formation du film muqueux en surface des produits carnés conservés sous vide ou de produits de salaison comme le jambon ou le bacon [48].

Les dextrans ou glucanes synthétisés pendant la fermentation malolactique et qui épaississent les liquides, rendent les produits visqueux ou gluants (filage). Un sirop de sucre contaminé par *Leuconostoc* peut se transformer en un gel compact [22,23].

Le dextrane produit par *Leuconostoc dextranum* cause des pertes économiques dans les stocks de la canne à sucre, il peut endommager jusqu'à 40 % du stock (Tallgren et al. 1999).

Les polysaccharides produits par *Ln.mesenteroides* sont reconnus par leur rôles néfastes en causant des problèmes au cours de raffinage des sucres (Tallgren et al. 1999).

IV.2 – problèmes liés à la production d'acide lactique et d'autres dérivés organiques

Le développement de la flore lactique sauvage et l'acidification non contrôlée entraînent une altération irréversible du produit. Il faut noter également qu'une acidification trop marquée est nuisible à l'affinage de certains fromages et à la qualité des yaourts par exemple, et il est également à l'origine de l'altération des produits

Partie II

Travail

Pratique

Matériel

et

Méthodes

Matériel et méthodes

L'intégralité de ce travail pratique a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie de l'université de Jijel.

Il a pour objectif de recouvrir les points suivants :

- La recherche , le dénombrement et l'identification des souches de *Leuconostoc* dans certains produits alimentaires .
- La poursuite du développement des métabolites produits par ces souches durant leur croissance .

II.1- Matériel

Pour réaliser notre travail , nous avons utilisé :

II.1-1- Matériel biologique

II.1.1.1- Les substrats

A fin d'isoler les souches de *Leuconostoc* qui nous seront servi de support biologique de notre étude , nous avons choisi trois (03) substrats biologiques d'origines différents .



- **Les viandes emballées sous vide** : ce produit est considéré comme une niche principale de *Leuconostoc* , impose son poids dans le marché algérien ces dernier temps et surtout le mois de ramadhan et le fête de l'aïd .
- **Lben** : c'est du lben traditionnel issu de lait de vache autochtone vendu en vracs.
- **Les olives** : olives vertes fermentés prélevés à partir d'un échantillon mis sur le marché local .

Ces olives sont fabriqués par ets. Bessaiah Mohamed , 13 rue' Kennedy SIG 29300 .

II.1.1.2- L'eau distillée stérile

Destinée pour la préparation des milieux de cultures .

II.1.1.3- Les antibiotiques

On utilise deux (02) types d'antibiotique : vaucomycine , tétracycline pour identifier le germe *Leuconostoc* parmi les autres genres des bactéries lactiques à la base du comportement de cette bactérie vis à vis de ces antibiotiques .

II.1.2- Milieux de culture

Au cours de notre étude , nous avons utilisé les milieux suivants :

- **MRS (Man Rogosa Scharpe)** gélose modifié : préparé au laboratoire additionné de 0.1ml de colorant de bleu d'aniline à 10 % à un flacon de 225 ml d'MRS pour spécifier de *Leuconostoc* .
- **MRS (Man Rogosa Scharpe)** bouillon : préparé au laboratoire , utilisé pour suivre le développement de *Leuconostoc* et facilite les mesures de la croissance et de dosage .
- **TSE (Tryptone-Sel-Eau)** : préparé au laboratoire , utilisé pour faire les dilutions .
- **Milieu MEVAG sans sucre** :(milieu d'étude de la voie d'attaque des glucides) pour la réalisation des profils de fermentation des sucres .
- **Les sucres** : pour établir le profil fermentaire des sucres , on a utilisé les 11 sucres suivants:arabinose , galactose , lactose , maltose , mannose , saccharose , dextrine , tréhalose , esculine , xylose , sorbitol .
- **Gélose hypersaccharosée** : pour la recherche de la production des polysaccharides par les *Leuconostoc* .
- **Milieu Clark et Lubs** : pour la recherche de l'acétoïne .

Matériel et méthodes

- **Milieu Gibson Abdel Malek** : sert à la détermination du type fermentaire du genre étudié.
- **Gélose à lait écrémé** : utilisée pour la recherche du citratase .

II.1.3 - Autres réactifs

Au cours de notre étude , nous avons utilisé :

- Violet de gentiane , fuchsine , lugol , alcool , l'huile à émersion pour la coloration de Gram .
- L'eau oxygénée pour le test de catalase .
- L'huile de vaseline utilisé au cours de profil fermentaire des sucres pour favoriser l'anaérobiose .
- Bleu de coomassie G250 pour le dosage des protéines .
- L'anthrone , H_2SO_4 pour le dosage des sucres .
- NaOH , NaCl .

II.1.4 – L'appareillage

Nous avons utilisé lors de notre manipulation le matériel suivant :

- Bec benzen
- Etuve
- pH mètre
- Centrifugeuse
- Agitateur magnétique
- Réfrigérateur
- Mixeur
- Bain Marie (Gerhardt)
- Autoclave (SHI AVX electronic)
- Four Pasteur (pour la stérilisation de la verrerie)

- Pipettes Pasteur
- Pipettes graduées
- Becher
- Boite de Pétri
- Tubes à essai
- Lames
- Microscope optique
- Balance (Denyer instrument XP- 600)
- Anse de platine
- Spectrophotomètre

II.2 – Méthodes

II.2.1 – Isolement , dénombrement et l'identification des *Leuconostoc*

II.2.1.1 – Préparation des solutions mères et des dilutions décimales

- **Les substrats solides** (les viandes emballées sous vide , les olives) : pour chaque produit alimentaire on prélève trois (03) sous unités , et pour chaque sous unité on suit le même processus suivant :

On commence par le broyage d'une quantité suffisante du produit à l'aide d'un mixeur bien stérile , puis on pèse 10g de broyat , la quantité prélevée est transférée aseptiquement dans un flacon contenant 90 ml de TSE , après l'homogénéisation on obtient une solution mère de 10^{-1} .

Pour la réalisation des dilutions décimales de 10^{-2} , on introduit 1ml de solution mère dans 9 ml de TSE . Enfin , on fait l'agitation manuellement du tube pour rendre la dilution homogène .

- **Les substrats liquides (Lben)** : à partir du Lben qui considère comme une solution mère (10^0) et après l'homogénéisation , on prélève 1ml à l'aide d'une pipette stérile et on lui ajoute à 9 ml du TSE contenue dans un tube à essai

stérile , on obtient alors une dilution de 10^{-1} [44] .

II.2.1.2 – Recherche et isolement des *Leuconostoc*

L'ensemencement en surface permet d'étudier la morphologie coloniale , mais ne permet pas d'obtenir une grande quantité de culture , pour cette raison on utilise la technique de la double couche qui assure l'anaérobiose .

Dans cette technique on transfère 1 ml de chaque dilution dans des boites de Pétri en utilisant une pipette propre , ensuite 10 à 15 ml du milieu **MRS** gélosé modifié sont coulés dans la boite et mélangés soigneusement avec l'inoculum par un lent mouvement circulaire horizontal , on laisse le mélange solidifier . Après solidification , une deuxième couche de gélose est coulée au dessus de la première en respectant la température de 45 °C . Pour la deuxième couche on utilise un milieu gélosé identique au milieu de culture (**MRS** modifié) [22] .

Pour bien isoler les souches de *Leuconostoc* et ainsi obtenue une culture pure, on utilise deux gammes d'antibiotiques qui sont additionnés en surface sous forme de disques :

- La tétracycline : qui est inhibiteur pour les seuls *Lactococcus* [22] .
- La vancomycine : exerce son action uniquement sur les Gram positifs et seuls les *Leuconostoc* peuvent le résister [50] .

Les boites sont incubées durant 48 heures à 72 heures à 37 °C et ils sont placées couvercle en bas , pour éviter que l'eau de condensation ne vienne en contacte avec la culture [22] .

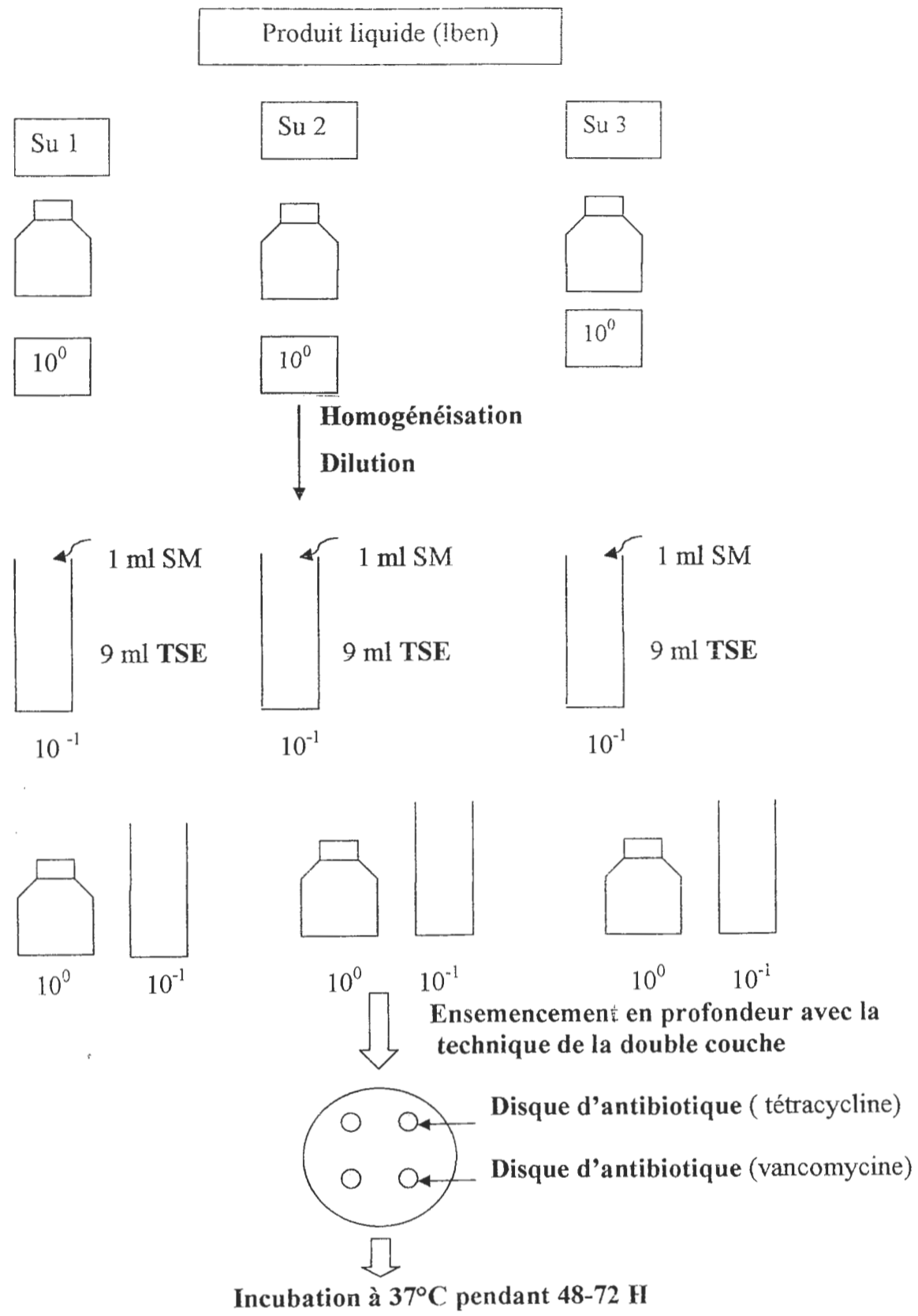


Fig.05 : Plan de préparation de solution mère , dilutions décimales et isolement de souches de *Leuconostoc* à partir d'un échantillon liquide (Lben) .

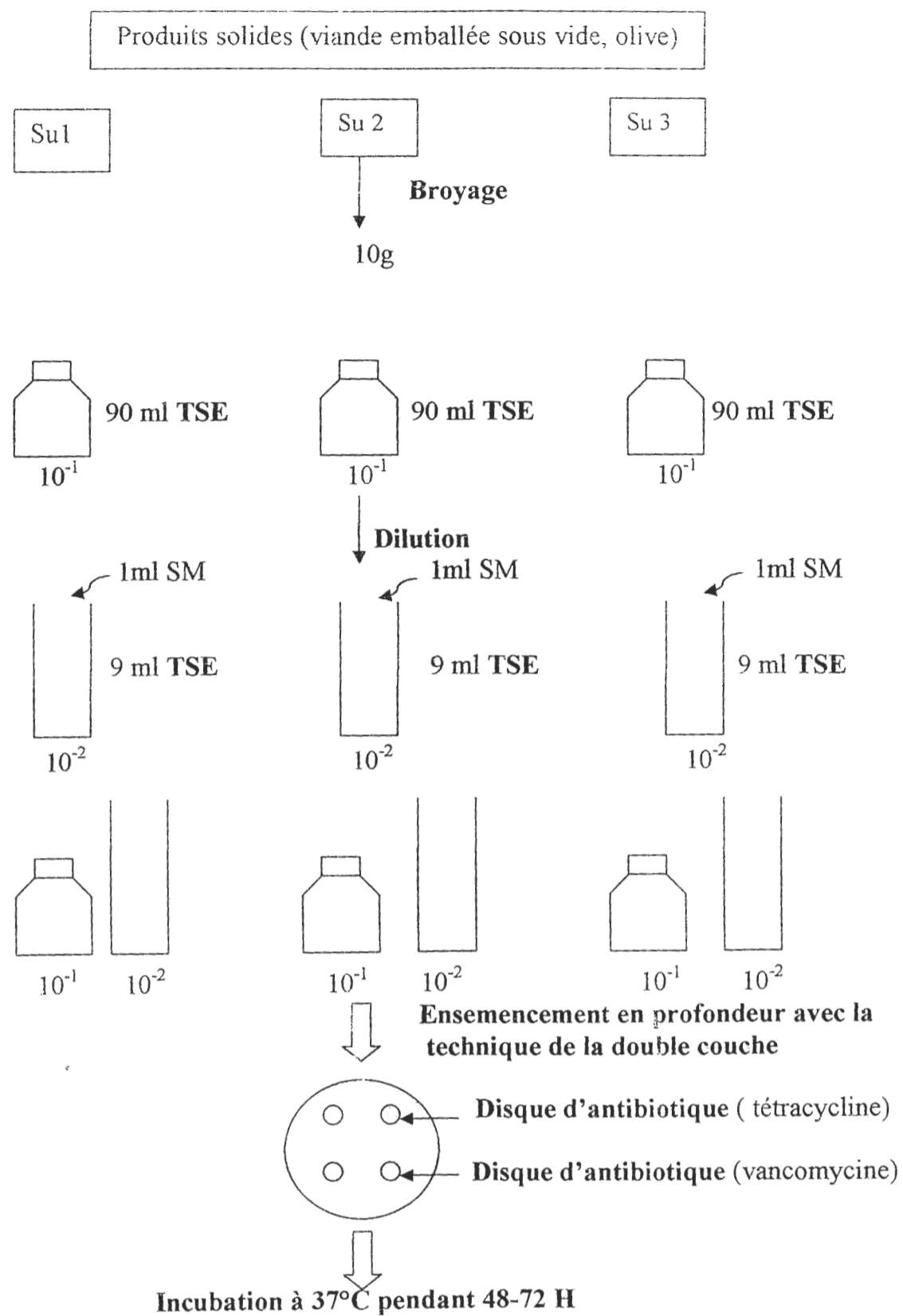


Fig.06 : Plan de préparation de solution mère , dilutions décimales et isolement de souches de *Leuconostoc* à partir d'un échantillon solide .

II.2.1.3 – Dénombrement des *Leuconostoc*

Sous cette appellation sont présentées les colonies qui renferment les caractéristiques de *Leuconostoc* (la forme , la production des exo polysaccharides et la résistance au vancomycine) .

II.2.1.4 – Identification

Les méthodes classiques d'identification sont basées sur la recherche pour chaque souche de certain nombre de caractères morphologiques , physiologiques et biochimiques , les plus importants sont les suivants : [15]

- Coloration de Gram
- Morphologie
- Recherche de la catalase
- Production de l'acétoïne
- Recherche de l'arginine dihydrolase
- Recherche de type fermentaire
- L'aptitude à fermenter les sucres

II.2.1.4.1 – Examen macroscopique

Ce test vise à voir la taille des colonies , leur couleur et leur forme sur les boites de Pétri qui contiennent la gélose **MRS** modifiée , après l'incubation à 37°C pendant 72 heures .

II.2.1.4.2 – Examen microscopique

Ce test est révélé par la coloration de Gram et la coloration simple , celles ci permettent successivement de faire la différenciation entre le Gram positif et le Gram négatif , les bâtonnets et les coques .

Elle est basée sur la différence de structure de la paroi et selon la composition et la perméabilité [21,44] .

Matériel et méthodes

Les étapes de la coloration de Gram sont les suivantes :

- Etalement et fixation par la chaleur de la suspension bactérienne sur une lame porte objet .
- Coloration pendant une minute au violet de gentiane ou au cristal violet .
- Lavage à l'eau .
- Coloration au lugol pendant une minute .
- Lavage à l'eau .
- Rinçage à l'alcool .
- Contre coloration pendant 1 à 2 minutes par une solution de Fuschine diluée à 10% ou par une solution de Safranine.
- Lavage à l'eau.

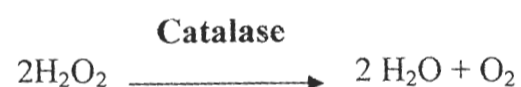
Après séchage , la lame est soumise à une observation microscopique avec objectif à immersion . Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet .

II.2.1.4.3 – Tests physiologiques et biochimiques

II.2.1.4.3.1 – Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme contenant du fer, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui est toxique, en eau et en oxygène, et qui est synthétisée par la plupart des bactéries aérobies au cours de leur métabolisme.

Ce test consiste essentiellement à exposer les cellules bactériennes au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La présence du catalase se manifeste par la formation de bulles de gaz (oxygène) selon l'équation suivante :



II.2.1.4.3.2 – Recherche de l'arginine dihydrolase (ADH)

La recherche de cette enzyme est intéressante, cette enzyme libère l'ammoniac et la citruline à partir de l'arginine.

Pour réaliser ce test nous avonsensemencé le milieu **Moeller** enrichi avec de l'arginine par le germe à tester et on incube à 37°C pendant 24 heures.

La culture dans le milieu de base se manifeste par virage au jaune dû au métabolisme du glucose. La dégradation de l'arginine et la libération d'ammoniac empêchent le virage au jaune.

II.2.1.4.3.3 – Production de dextrans

Nous avonsensemencé aseptiquement les différentes suspensions bactériennes en stries sur le milieu hypersaccharosé que l'on a préparé préalablement au laboratoire, ensuite on les a incubé à 37°C pendant 24 heures.

La production de polysaccharides se manifeste par la présence de colonies larges et gluantes.

II.2.1.4.3.4 – Production d'acétoïne

Ce test permet de caractériser la présence d'acétyl-méthyl-carbinol-acétoïne, qui est un corps intermédiaire dans la formation de butylène glycol (2,3 – butane diol).

On ensemence le milieu **Clark et Lubs** , puis on l'incube à 37°C pendant 24 heures . Après incubation , nous avons ajouté 0.5 ml de solution VPI et 0.5 ml de solution VPII pour chaque tube présentant un trouble (résultat positif) , on agite énergiquement et on les laisse reposer 10 min à température ambiante .

La production de l'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau rouge .

II. 2.1.4.3.5 – Recherche de la citratase

Cette recherche est faite on inoculant le germe à étudier sur gélose semi solide au lait écrémé stérilisé , additionné du citrate de sodium stérile et un apport de gélose blanche elle même stérilisée préalablement .

La décomposition du citrate se manifeste par la production de gaz dans la masse du milieu en 03 à 05 jours d'incubation à 30 °C [42] .

II.2.1.4.3.6 – Recherche de type fermentaire

Ce test permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est transformé , il consiste à mettre en évidence la formation du gaz (CO₂) , donc nous avons préalablement préparé le milieu **Gibson Abdel Malek** pour réaliser ce test, puis nous l'avons ensemencé par les souches à tester et on a ajouté un bouchon de gélose à la surface . L'incubation est faite à 37°C pendant 24 heures .

Le développement d'une bactérie homofermentaire ne provoque pas de discontinuité entre le milieu et le bouchon de la gélose , par contre le gaz produit par un métabolisme hétérofermentaire pousse le bouchon vers le haut du tube .

II.2.1.4.4 – Le profil fermentaire

Ce test permet d'apprécier la capacité des souches étudiées à fermenter quelques sucres . Le test est réalisé par ensemencement des tubes du milieu **MEVAG** additionné de sucres à étudier , et pour favoriser l'anaérobiose on ajoute un volume de l'huile de paraffine stérile .

Après 24 heures d'incubation , le développement de la culture et le virage de l'indicateur coloré dû à l'acidification du milieu traduit la fermentation du sucre testé .

A noter que ce test a été réalisé sur 11 sucres .

II.2.2 – L'étude de quelques mesures de croissance

Pour étudier le développement de la croissance des *Leuconostoc* et leur conséquence, nous avons inoculé dix (10) colonies caractéristiques dans 9 ml du milieu d'enrichissement TSE, puis on fait l'agitation pour obtenir une solution homogène, ce volume est ajouté à 225 ml du bouillon MRS stérile, puis on fait l'incubation à 37°C.

On suit la variation du pH durant 15 jours, et pour chaque jours on prélève deux tubes de 5 ml, l'un est orienté vers le dosage des protéines et l'autre vers le dosage des exo polysaccharides.

II.2.2.1 – Détermination du pH

On prélève un volume du produit sur lequel on note directement le résultat indiqué par le pH mètre [43].

II.2.2.2 – Dosage des protéines

- **Principe :** Bradford et al. (1976) ont développé une méthode basé sur l'absorption du colorant bleu de coomassie G250.

En milieu acide, ce colorant se fixe rapidement sur les protéines, et cette complexation provoque un transfert de son pic d'absorption qui passe du rouge au bleu.

Cette méthode est très sensible (2-5 µg de protéines) et très rapide, elle est aussi assez résistante à la plus part des interférents qui nuisent la plus part des autres méthodes tel que la méthode de LOWRY (0.2-20 µg de protéines).

➤ Mode opératoire

Traitement des échantillons : des aliquotes de cultures sont centrifugées à 5000 gravités pendant 20 min pour faire sédimenter les cellules bactériennes (culot cellulaire).

- Prendre 0.5 ml du culot cellulaire auquel on ajoute un volume égal du NaOH 2N.
- Vortexer longuement pour remettre le culot en suspension.
- Porter le mélange au bain Marie à 100°C pendant 30 min.

Dosage : à 0.1 ml d'échantillon, ajouter 1ml du réactif au bleu de coomassie G250.

- Agiter par vortex ou retournement.
- Laisser reposer 3 min.
- Lire l'absorbance à 595 nm.
- La teneur des culots cellulaires en protéines est déterminée par comparaison avec une droite de corrélation.

$$\text{Densité optique} = F (\text{albumine bovine}) \quad [8].$$

Résultats

et

Discussion

Résultats et discussion

III.1- Isolement , dénombrement et identification des souches

Au cours de cette étude , 09 souches de *Leuconostoc* ont été isolées :

- 03 souches isolées à partir du lben .
- 03 souches isolées à partir des olives .
- 03 souches isolées à partir de la viande emballé sous vide .

III.1.1- Examen macroscopique

Les colonies isolées sur **MRS** modifié sont des colonies de même taille , bien isolées de couleur bleue qui indique la fixation du bleu d'aniline par la membrane cellulaire de *Leuconostoc* , d'aspect gluant à pourtour régulier , et elles ont des formes circulaires lenticulaires .

III.1.2 – Dénombrement

Après l'isolement et le dénombrement des colonies caractéristiques du *Leuconostoc* sur milieu **MRS** modifié , nous avons obtenus les résultats illustrés dans le tableau 06 et qui sont exprimés en nombre de germe par millilitre .

➤ Les souches isolées de la viande :

La présence des *Leuconostoc* avec un moyen d'environ 70% des bactéries lactiques (présente des concentrations de $10^7 - 10^8$) s'avère beaucoup par rapport aux autre bactéries lactiques qui ne sont pas pris en considération dans notre étude , cela s'explique par une compétition très rapide entre les différents espèces des bactéries lactiques et même d'autre bactéries contaminantes , ce qui facilite l'apparition précoce

Résultats et discussion

des défauts . Notre résultat correspond aux travaux de **Borch** et *al.* qui trouvent des résultats similaires après le recensement les bactéries capables de se développer et d'entraîner une altération des viandes où des produits à base de viande de bœuf cuite ou crus quelque soit le mode de conditionnement utilisé (sous vide ou sous atmosphère modifiée) .

Tableau 06 : Evolution du nombre des *Leuconostoc* dans les trois échantillons pendant 03 jours .

Echantillons		L'évolution pendant les jours (nombre de germes par millilitre)		
		1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour
Viande	Su 1	1.32×10^5	2.13×10^5	4.12×10^5
	Su 2	1.49×10^5	2.40×10^5	4.13×10^5
	Su 3	1.93×10^5	3.80×10^5	5.08×10^5
Lben	Su 1	8×10^3	3.71×10^4	5.04×10^4
	Su 2	7.09×10^3	3.63×10^4	4.96×10^4
	Su 3	7.27×10^3	3.68×10^4	4.98×10^4
Olive	Su 1	8.09×10^4	2.02×10^5	2.38×10^5
	Su 2	9.09×10^4	1.36×10^5	2.21×10^5
	Su 3	8.63×10^4	1.19×10^5	1.36×10^5

➤ Les souches isolées du lben :

Les espèces utilisées en industries laitières pour la fabrication de certains produits laitiers , celles qui se trouvent dans le lait à l'état naturel et enfin celles responsables d'altération .

Le *Leuconostoc* constitue avec les Streptocoques homofermentaire la quasi totalité de la charge microbienne du lben et est à l'origine de certaines propriétés organoleptiques de ceci (odeur , flaveur) , il présente 5.04×10^4 germes par millilitre soit moins élevés que les résultats trouvés par **Harrati** (1974) 96×10^6 germes par

Résultats et discussion

millilitre , qui travaillant sur lben familial Algérien à montrer que 90% des microorganismes totaux du lben sont des Streptocoques lactiques , elle cité *Streptococcus lactis* , *Streptococcus cremoris* , *Leuconostoc dextranum* , *Leuconostoc mesenteroides* , *Leuconostoc drovonium* [26] .

➤ Les souches isolées des olives :

Notre analyse révèle un nombre élevé de *Leuconostoc* dans les olives fermentés évalué d'une moyenne de 2×10^5 germes par millilitre , se qui est expliqué par l'intervention de ce germe dans les différentes phases de fermentation des olives qui est effectuée dans des saumures de concentrations différentes selon la variété , ce dernier favorise les bactéries lactiques en inhibant de nombreux germes gênants [22,30] .

III.1.3 – Examen microscopique

Une observation au microscope optique après coloration de Gram montre que les 09 souches sont des Gram positif (coloration violette) présentées en cocci isolés , en diplocoques et en chaînettes plus ou moins longues comme les photos 07 et 08 montrent .

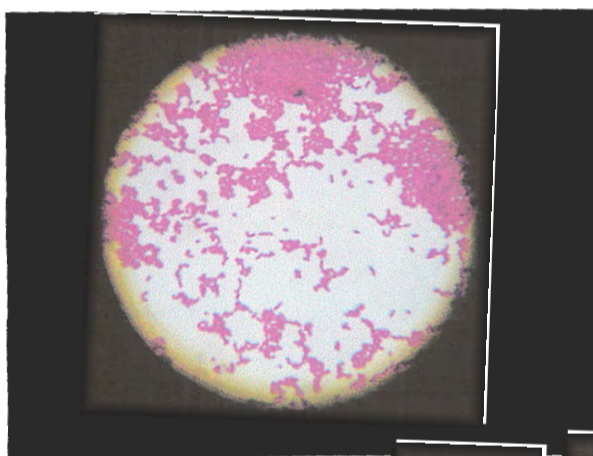


Photo . 07 : Résultat de la coloration de Gram pour les souches isolées de la viande .

Résultats et discussion

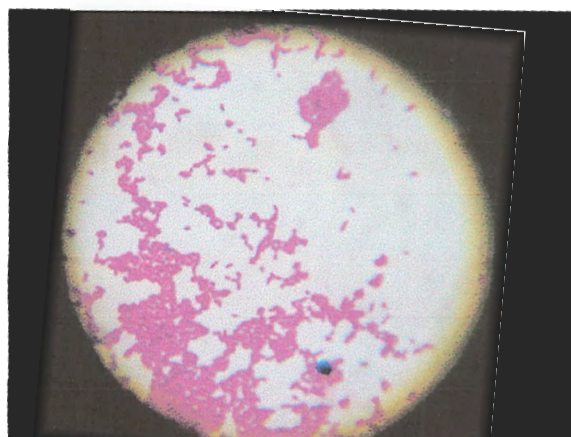


Photo . 08 : Résultat de la coloration de Gram pour les souches isolées du lben .

III.1.4 – Les tests physiologiques et biochimiques

Tableau 07 : Profils biochimiques des souches isolées .

Tests	Viande			Lben			Olive		
	V 1	V 2	V 3	L 1	L 2	L 3	O 1	O 2	O 3
Vancomy- cine	R +	R +	R +	R +	R +	R +	R +	R +	R +
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Forme	Coque	Coque	Coque	Coque	Coque	Coque	Coque	Coque	Coque
Catalase	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Culture à 39°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétoïne	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Type fermen- taire	Hétér	Hétér	Hétér	Hétér	Hétér	Hétér	Hétér	Hétér	Hétér
Citratase	-	-	-	±	±	±	±	+	±
Production de polysacch- aride	+	±	±	+	±	±	-	+	+

R + : résistance positive pour la vancomycine . **Hété** : souches hétérofermentaires .

Résultats et discussion

Les résultats du tableau 07 révèlent le suivant :

- On note que toutes les souches obtenues se développent en présence de vancomycine , ce qui explique la résistance à cet antibiotique dû à la présence de gène codant pour cette propriété .
- Toutes les souches testées sont catalase négative , ce qui indique que ces souches appartiennent au groupe des bactéries lactiques .
- Toutes les souches n'ont pas la capacité de pousser à 39°C , ce sont des germes mésophiles .
- D'après les résultats relatifs à la recherche d'ADH , on note que toutes les souches donnent des résultats négatifs (couleur jaune) , ce qui explique l'absence du système de l'arginine dihydrolase qui est responsable de la dégradation de l'arginine .
- Pour la recherche d'acétoïne sur milieu **Clark et Lubs** les résultats étaient négatifs chez 08 souches (l'absence d'anneau rouge après l'addition du VPI et VPII) VP (-) , c'est à dire incapable de produire l'acétoïne , la souche restante donne un résultat positif VP(+).
- Ce qui concerne la recherche du citratase , on trouve qu' une seule souche est capable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone , ce qui est expliqué par l'absence d'un stimulateur de croissance , tel que l'extrait de levure , et la présence d'un plasmide codant pour cette capacité car le métabolisme du citrate est lié à un gène porté par un plasmide . Scinques (05) souches présentent des résultats intermédiaires et le reste des souches sont incapables d'utiliser le citrate comme source de carbone , qui est expliqué par l'absence de plasmide codant [14,16,30] .

Résultats et discussion



Photo .09 : Résultats du profil biochimique de la recherche de l'ADH ,
l'acétoïne et la citratase par une souche isolée de la viande .

- Pour la recherche du type fermentaire sur le milieu **Gibson Abdel Malek** , on trouve que toutes les souches sont hétérofermentaires caractérisées par la production du gaz qui a provoqué le gonflement de la gélose .
- Pour la recherche de la production des polysaccharides sur la gélose hypersaccharosée comme il est illustré dans la photo ci-dessous on note que huit (08) souches sont capables de produire des polysaccharides par le développement des colonies larges et opaques. Les autres souches donnent un résultat négatif .



Photo .10: Résultat de la production de dextrans par les souches isolées de la viande.



Photo . 11 : Résultat de la production de polysaccharides par les souches isolées du lben .

III.1.5- Identification par profil de fermentation des sucres

Les résultats du profil fermentaire des sucres de la souche V2 isolée de la viande sont illustrés dans la photo suivante :

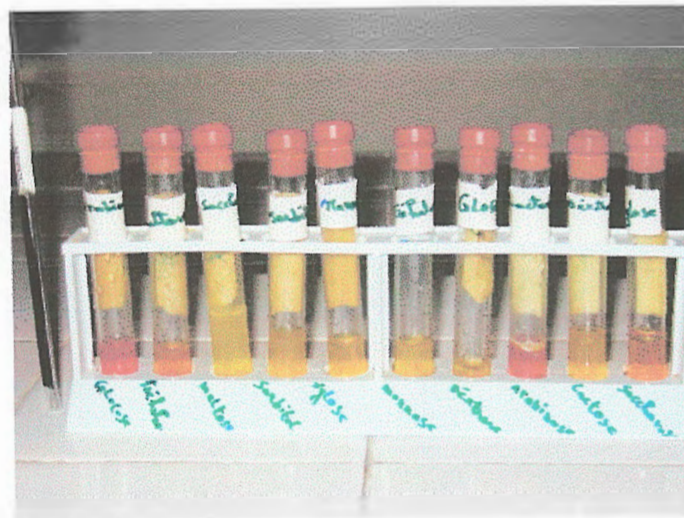


Photo . 12 : Profil fermentaire de la souche V2 isolée de la viande .

Résultats et discussion

Tableau 08 : Profils fermentaires des sucres des souches isolées .

Sucres	Viande			Lben			Olive		
	V 1	V 2	V 3	L 1	L 2	L 3	O 1	O 2	O 3
Galactose	-	±	-	+	+	+	±	±	±
saccharose	+	±	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	±	±	+	±	+	±	±	-	+
Esculine	±	+	±	+	+	+	-	±	+
Maltose	±	±	+	-	+	+	+	+	±
Arabinose	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Tréhalose	+	±	±	±	+	+	+	±	+
Sorbitol	±	+	+	±	+	±	+	+	+
Xylose	-	-	-	+	±	±	±	+	-
Dextrine	+	±	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	±	-	-	+	±	±	+	+	+

Les profils fermentaires obtenus et résumé dans le tableau 08 sont comparés avec le profil biochimique des *Leuconostoc* cité par **Deroissart et Luquet** (1994, modifié) on donnant les noms des espèces qui sont résumés dans le tableau 09 .

Tableau 09 : Identification des souches isolées .

Souches isolées	Espèces
V 1	<i>Leuconostoc sp</i>
V 2	<i>Leuconostoc sp</i>
V 3	<i>Leuconostoc sp</i>
L 1	<i>Ln.mesenteroides ssp</i>
L 2	<i>Ln.mesenteroides ssp</i>
L 3	<i>Ln.mesenteroides ssp</i>
O 1	<i>Leuconostoc sp</i>
O 2	<i>Ln.mesenteroides ssp</i>
O 3	<i>Ln.mesenteroides ssp</i>

D'après les résultats illustrés dans ce tableau on trouve que :

- La souche la plus dominante isolée de la viande est *Leuconostoc sp* (dans les trois échantillons V1, V2 , V3) avec un pourcentage de 100 % .
- Pour lben , la souche dominante est *Ln.mesenteroides ssp* (L1 et L3) avec un pourcentage de 66.66% de l'ensemble , à coté de *Ln.mesenteroides ssp* dans L2 avec un pourcentage de 33.33% .
- Par ailleurs , pour les olives la souche dominante est celle de *Ln.mesenteroides ssp* (O2 et O3) avec un pourcentage de 66.66% et l'espèce *Leuconostoc sp* est classée en deuxième ordre avec un pourcentage de 33.33 % .

L'étude comparative des profils fermentaires des sucres montre que les bactéries appartenant à la même espèce peuvent présenter des profils fermentaires différents , cette différence est beaucoup plus importante chez l'espèce *Leuconostoc sp* qui présente des biotypes V1 , V2 , V3 , la souche V1 est capable de fermenter le lactose , alors que les souches V2 et V3 sont incapables de le faire .

Résultats et discussion

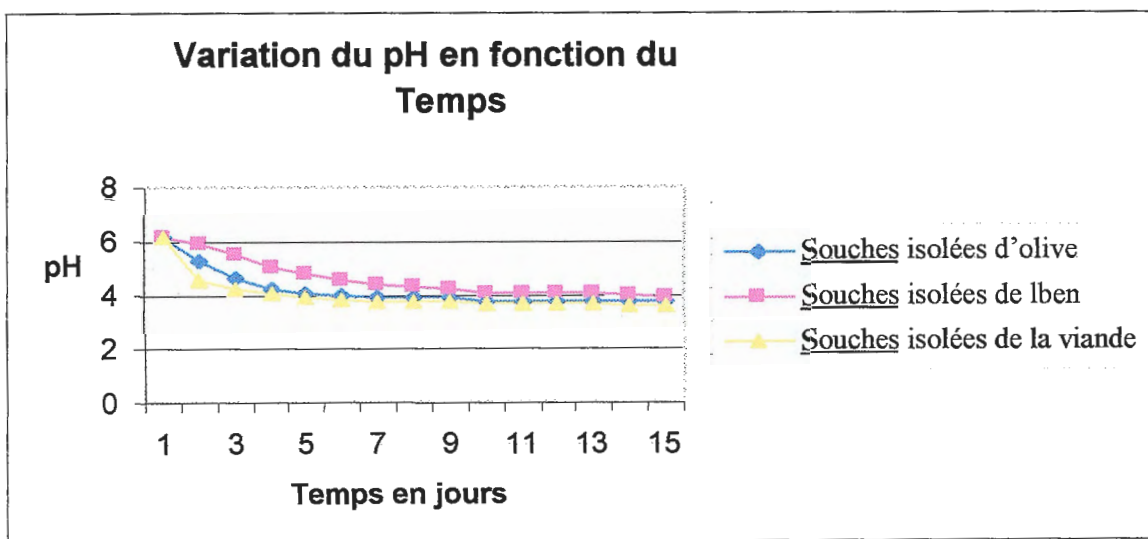


Fig. 13 : Variation du pH en fonction du temps .

Nous pouvons diviser l'allure illustrée dans la figure en trois phases principales :

- 1^{ère} phase (1^{er} jour – 5^{ème} jours) : correspond à la phase exponentielle de croissance , caractérisée par un décroissement brutal du pH dû à la production très importante des acides organiques tel que l'acide acétique , l'éthanol et notamment l'acide lactique qui est un acide suffisamment fort pour se dissocier et abaisser le pH d'une valeur mesurable [11,30] .

Pour les souches isolées à partir de la viande , on note que la diminution du pH est plus rapide que les autres souches isolées du lben et d'olive , cette diminution peut être expliquée par des interactions entre les souches de même espèces ou les espèces de même genre .

- 2^{ème} phase (6^{ème} jours – 10^{ème} jours) : correspond à la phase latente de croissance , nous avons noté dans cette phase une diminution faible du pH .
- 3^{ème} phase (11^{ème} jours – 15^{ème} jours) : le décroissement très lent ou la stabilisation du pH pendant la phase déclin de croissance peut être expliquée par une rétroinhibition des métabolites .

Résultats et discussion

III.2.2- Dosage des protéines

Les résultats des densités optiques obtenus à l'absorbance 595 nm sont représentés dans le tableau suivant .

Tableau 11 : Résultats de densité optique à l'absorbance à 595 nm .

Souches isolées de Jours	Lben	Olive	Viande
	D.O	D.O	D.O
J1	1.11	1.43	1.28
J2	1.44	1.51	1.32
J3	1.49	1.56	1.53
J4	1.38	1.63	1.68
J5	1.22	1.76	1.60
J6	1.17	1.69	1.53
J7	1.09	1.57	1.23
J8	0.9	1.32	0.94
J9	0.86	1.25	0.89
J10	0.79	1.01	0.77
J11	0.63	0.84	0.73
J12	0.55	0.77	0.65
J13	0.49	0.68	0.52
J14	0.42	0.54	0.38
J15	0.39	0.4	0.27

Par utilisation de la courbe de corrélation (fig. 14) , on peut déterminer la teneur des culots cellulaires en protéines qui est exprimée en μg de protéine / ml du milieu .

Résultats et discussion

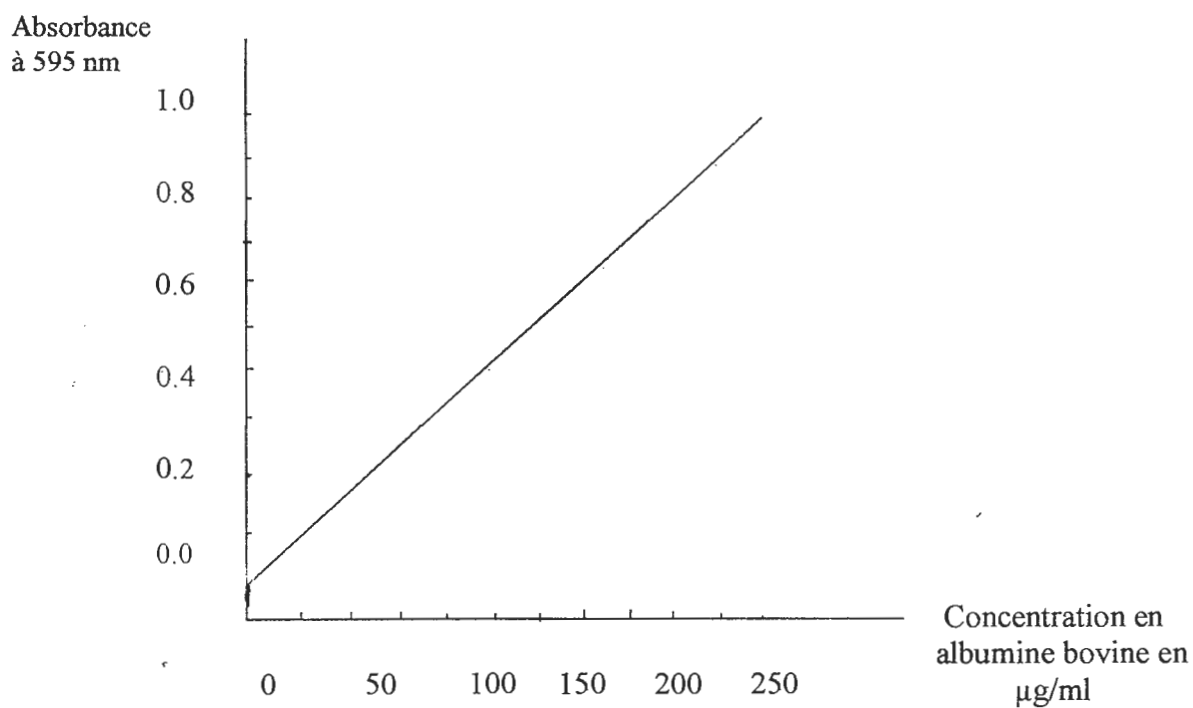


Fig.14 : courbe de corrélation , absorbance à 595 nm en fonction de la concentration en sérum albumine bovine (BSA) , utilisée pour la détermination des protéines cellulaires par la méthode de Bradford .

Résultats et discussion

Tableau 12 : Concentration des protéines dans les culots cellulaires .

Souches isolées de Jours	Lben	Olive	Viande
	Concentration de protéine ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration de protéine ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration de protéine ($\mu\text{g/ml}$)
J1	277.5	355	315
J2	357.5	375	327.5
J3	367.5	387.5	332.5
J4	340	407.5	417.5
J5	302.5	435	397
J6	290	420	380
J7	270	390	350
J8	225	330	332.5
J9	215	312.5	200
J10	195	252.5	190
J11	155	210	180
J12	135	187.5	160
J13	120	170	127.5
J14	102.5	135	92.5
J15	90	95	65

Les résultats du tableau 12 sont représentés par la figure 15 .

Résultats et discussion

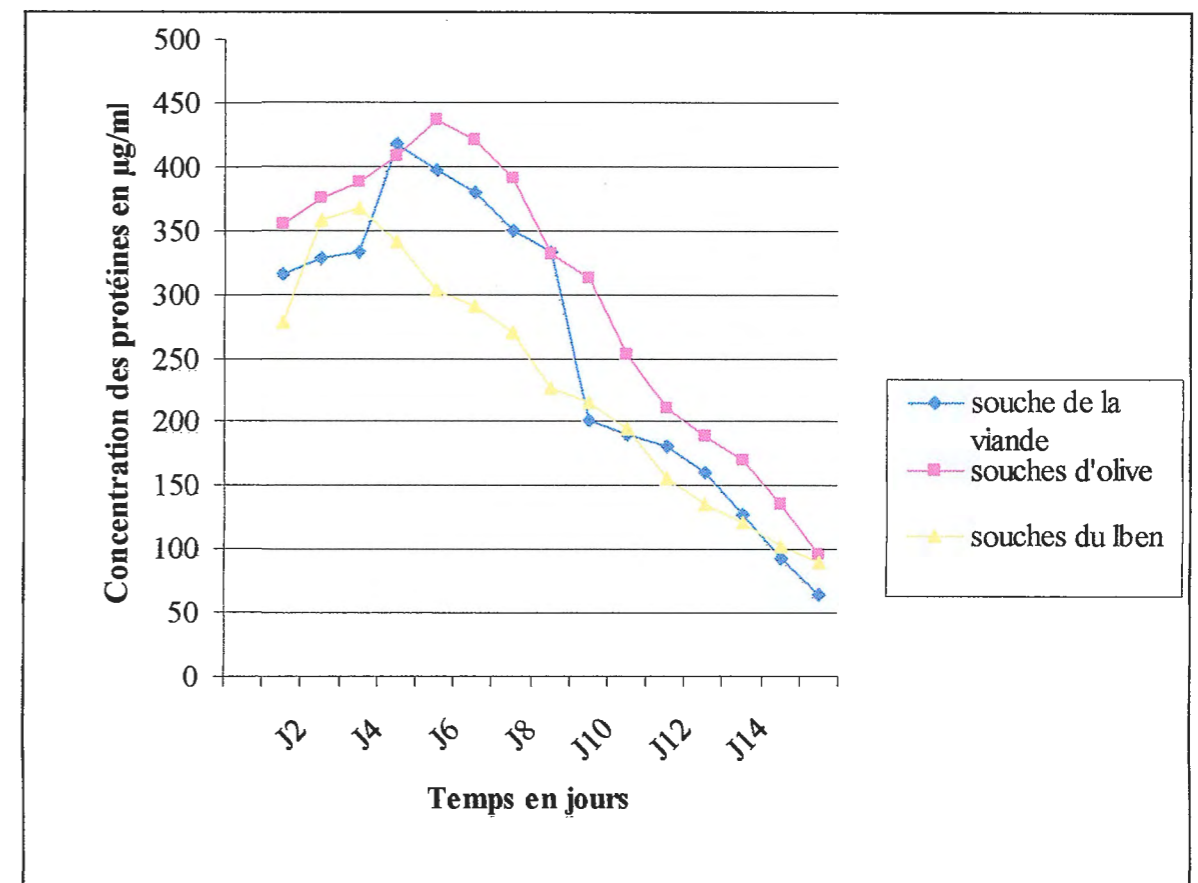


Fig. 15 : Variation des concentrations des protéines du culots cellulaires en fonction du temps .

Dans les premiers temps , nous avons noté une augmentation des concentrations des protéines dans les culots cellulaires de toutes les souches isolées , se qui traduit par une production notable des protéines pendant la phase initiale de croissance (du 1^{er} jour au 4^{ème} jours) .

La production des protéines conduit à la formation de nombreux enzymes qui peuvent provoquées la transformation des substrats du milieu [23] .

En deuxième temps et à partir du quatrième jours , nous avons remarqué une diminution progressive de la production des protéines , dû à l'orientation de la souche vers la production des exo polysaccharides , qui est remarquée par une hyper viscosité

Résultats et discussion

du milieu , ce qui entraîne divers altérations notamment dans les viandes emballées sous vide et les sucres pendant le processus de raffinage .

On remarque qu'il y a une légère différenciation dans la production des protéines , ce qui est expliquée par la diversité des niches d'isolement (lben , viandes emballées sous vide et olives fermentés) et la nature des souches existantes .

Mais pratiquement , les courbes de production des protéines sont para semblables , ce qui indique que dans les trois substrats les souches de *Leuconostoc* ont suivi le même profil de biosynthèse qui tends dans les premiers jours vers une hyper production des polysaccharides en faveur de la biosynthèse des protéines . Donc on peut dire que ces souches préfèrent les sucres comme première source de carbone et la forte production des polysaccharides ce traduit par une volonté de leur réutilisation où cas où le substrat initial est achevé et/ou complètement utilisé , ou alors pour se protéger des conditions astreingentes du milieu (diminution du pH) , c'est une forme de compétition intra ou extra population bactérienne .

Conclusion

Conclusion

L'étude expérimentale de notre recherche est divisée en deux parties , la première a porté sur l'isolement , dénombrement et l'identification de *Leuconostoc* à partir des trois substrats différents (lben , viande emballée sous vide , olives fermentés) , à travers cette partie nous avons obtenu une collection de 09 souches représenté par trois espèces : *Leuconostoc sp*, *Leuconostoc mesenteroides* .

Dans la deuxième partie , on s'intéresse à suivre quelques mesures de croissance :

L'étude de l'évolution du pH au cours de croissance des souches identifiées montre une grande hétérogénéité , ce qui explique la diversité de production de métabolites responsables de la diminution du pH (acide lactique , acide acétique , éthanol , CO₂) pendant les différentes phases de croissance .

Le dosage des protéines affirme que les *Leuconostoc* sont des souches initiales " starter " stimulent la dégradation du substrat qui se traduit par une production notable des protéines , suivi par une diminution progressive de celle ci qui indique l'orientation des souches vers la production des polysaccharides .

A l'instar des résultats obtenu au cours de notre expérimentation nous pouvons conclure que les souches présentant des intérêts technologiques aussi bien qu'économiques peuvent également présenter des effets indésirables dû à leur métabolites .

La réduction de ces effets néfastes peut être réaliser par application de l'une des techniques de limitation de contamination qui est " HACCP " (Ausard analysis critical control point) . Le concept HACCP est un système d'assurance de la qualité qui donne une méthodologie pour identifier et évaluer les dangers associés en différents étapes d'une production et pour définir les moyens nécessaires à leur maîtrise . Il présente l'intérêt d'un système cohérent d'aide à l'analyse et à la décision , impliquant l'ensemble des opérateurs d'une chaîne de fabrication .

Références bibliographiques

- 1- **Alais C.** 1984 , Science du lait , principes des techniques laitiers .
édition *Lavoisier* , (Paris) , pp : 3 – 24 .
- 2- **Alais C.** 1975 , Principes des techniques laitiers .
édition *S.E.P* , (Paris) , pp : 3-43 .
- 3- **Atlan D , Aubel D. et Gilbert C.** , 2000 , La biodiversité des bactéries lactiques
et les conséquences sur leur protéinase .
Edition sciences des aliments , **20 (01)** , pp : 5-17 .
- 4- **Barker et Ajongween** , 1991 , The production of enzym dextran sucrose using
fermentation technics biotechnal .
édition *bioengin* , pp : 37-707 .
- 5- **Boulbair S. , Dalichaouche N.** ,2000 , Détermination des facteurs physiques pour
la production de la dextrane saccharase par deux souches de *Leuconostoc*
mesenteroides : 5417 , 20088 , mémoire d'ingénieur d'état , INATA , université de
Constantine , pp : 4-6 .
- 6- **Bourgeois J-Y. , Leveau** , 1991 , Techniques d'analyse et de contrôle dans
les industries agro-alimentaires , vol 3 , 2^{ème} édition , pp : 170-173.
- 7- **Borche et al.**, 1996 , Spoilage of meat and cured meat products , pp : 101-108.
- 8- **Bradford M.** , 1976 A , Rapid and sensitive method for the quantitation of
microgram quantities of proteins utilising the principe of proteins – dye binding aral-
biochem [développement initial de la méthode au bleu de coomassie] , pp : 54-248.
- 9- **Branger A.** , 2004 , Technique d'ingénieur , fabrication de produits alimentaires
par fermentation :les ferment F 3500 .
édition *tech et doc* , *Lavoisier* , pp : 1-14.
- 10- **Carbonnelle B., Denis E. , Marmonier A. , Pinoin G. et Vargues R.** , 1987
Bactériologie médicale ,
édition techniques usuelles simp SA , (Paris , France) , *ISBN2* , **83334** , pp : 246-370.

Références bibliographiques

- 11- **Carole L.** , et **Vignola A.** , 2002 , Science et technologie du lait ,
éditrice scientifique, pp : 30.
- 12- **Cogan M.** , 1996 , Dairy starter culture ,
Edition Cogant , Mand Accolas , pp : 277 .
- 13- **Collins M.** , **Roorigues U.** , **Ashc , Agh , Rem , Farrow Jae , Martinez ,
Murciaa , Philips B.A. , Williams A.M. and Wallbankss** , 1990
FEMS microbial letters , (77) , pp : 5-12 .
- 14- **Dacosta Y.** et **Aôut** , 2000. La bio production des aliments : l'antagonisme
microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologique ,
édition Dacosta , (Paris) , 3.21 , pp : 8-29.
- 15- **Deroissart H.B.** , 1986 . Bactéries lactiques in : lait et produit laitier ,
par F.M.L.U.Q.E.T .
édition *tech et doc* , *Lavoisier* , pp : 3-43 .
- 16- **Desmazaud M.J.** , 1983. L'état des connaissances en matière de nutrition des
bactéries lactiques .
Edition *le lait* , 63 , pp : 9- 48 .
- 17- **Desmazaud M.** , 1996 . Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaines :
utilisation et innocuité .
Edition cahier agriculture , 1996 (5) , pp : 331-343.
- 18- **Desmazaud M.** , 2001 . Les bactéries lactiques dans l'alimentation : utilisation
et innocuité .
Edition agriculture , pp : 5-96 .
- 19- **Dicks** , 1990 , **Dicks L.M.** , 1995 . International journal .
Edition syst bacteriologie (45) , pp : 395-397 .
- 20- **Garvie E.I.** , 1984 . Separation of species of the genus *Leuconostoc* and
differentiation of the *Leuconostoc* from other lactic acid bacteria .
Edition methods in microbiology academic press , (London) , pp : 174 – 178 .

Références bibliographiques

- 11- **Carole L.** , et **Vignola**, 2002 , Science et technologie du lait ,
éditrice scientifique, pp : 30.
- 12- **Cogan M.** , 1996 , Dairy starter culture ,
Edition Cogant , Mand Accolas , pp : 277 .
- 13- **Collins M.** , **Roorigues U.** , **Ashc** , **Agh** , **Rem** , **Farrow Jae** , **Martinez** ,
Murciaa , **Philips B.A.** , **Williams A.M.** and **Wallbankss** , 1990
FEMS microbial letters , (77) , pp : 5-12 .
- 14- **Dacosta Y.** et **Aôut** , 2000. La bio production des aliments : l'antagonisme
microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologique ,
édition Dacosta , (Paris) , 3.21 , pp : 8-29.
- 15- **Deroissart H.B.** , 1986 . Bactéries lactiques in : lait et produit laitier ,
par F.M.L.U.Q.E.T .
édition *tech et doc* , *Lavoisier* , pp : 3-43 .
- 16- **Desmazaud M.J.** , 1983. L'état des connaissances en matière de nutrition des
bactéries lactiques .
Edition *le lait* , 63 , pp : 9- 48 .
- 17- **Desmazaud M.** , 1996 . Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaines :
utilisation et innocuité .
Edition cahier agriculture , 1996 (5) , pp : 331-343.
- 18- **Desmazaud M.** , 2001 . Les bactéries lactiques dans l'alimentation : utilisation
et innocuité .
Edition agriculture , pp : 5-96 .
- 19- **Dicks** , 1990 , **Dicks L.M.** , 1995 . International journal .
Edition syst bacteriologie (45) , pp : 395-397 .
- 20- **Garvie E.I** , 1984 . Separation of species of the genus *Leuconostoc* and
differentiation of the *Leuconostoc* from other lactic acid bacteria .
Edition methods in microbiology academic press , (London) , pp : 174 – 178 .

Références bibliographiques

- 21- **Guiraud J. et Galzy P.**, 1989 . Analyse microbiologique dans les industries .
Edition usni nouvelles (Paris) , pp :89-92.
- 22- **Guiraud J.** 1998 . Microbiologie alimentaire ,
Collection sciences et techniques agro alimentaires (Paris) , pp : 90-92.
- 23- **Guiraud J.** 2003 . Microbiologie alimentaire .
Edition *Dunod* (Paris) , pour la nouvelle présentation , pp :183-202.
- 24- **Hamames N** , 1996 . Isolement , identification et caractérisation des bactéries lactiques du lait de vache locale , thèse de magister , institut des sciences de la nature , *université de Constantine*, 110 , pp : 6-10.
- 25- **Hounhoïgan D.J. , Noutm J.R. , Nago C.M. , Houben J.H. and Bouts F.M.** , 1993 .Characterization and frequency distribution of species of lactic acid bacteria involved in the processing of marve , a fermented maize dough from benin .
Edition *international journal of food microbiology* 1993 , 18(4) , pp : 279-287.
- 26- **Khecha M.** 1987 . Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état , contribution à l'étude physico-chimique et microbiologique du lben artisanal fabriqué à Constantine , *INATA* , Constantine , pp : 19-23.
- 27- **Lambin S.** , 1969 . Précis de microbiologie , tome I .
Edition *Massow et Cie* (Paris) , pp : 1-52.
- 28- **Larpent J-P., Larpent M.** 1997. Mémento technique de microbiologie.
3^{eme} édition , *Lavoisier Tec et Doc.*, pp : 580 .
- 29- **Larpent J.**, p 1991. Les ferments microbiens dans les industries agro alimentaires, (produits laitiers et carnés) .
Edition *Lavoisier , Tec et Doc*, pp : 9-128.

Références bibliographiques

- 30- **Larpent J.P , Bourgois C.M** , 1996. Microbiologie alimentaire , tome II .
2^{ème} édition , *Lavoisier , Tec et Doc*, pp : 13-14.
- 31- **Lausing M. et Prescott T.** 2003 .Microbiologie .
2^{ème} édition , bibliothèque nationale du Paris , , *bibliothèque nationale royal Albert* ,
Bruxelles , pp : 530 .
- 32- **Leclerc H. , Buttiaux R. , Ghilaume J. et Wattere P.** , 1977. Microbiologie
appliqué .
Edition *Doin* , institut de Lille , pp : 1-80.
- 33- **Leclerc H. , Lard D. , Husson M.O. , Wattere P. et Jakubeza K.** , 1986 .
Microbiologie générale .
edition Doin , pp : 167-242.
- 34- **Leminovr L. et Veron.M.** , 1982. Bactériologie médicale , pp : 550-557.
- 35- **Lenoir J., Hermier J. et Weber F.**, 1992 . Les groupes microbiens d'intérêt
laitiers , pp : 9-40.
- 36- **Leveau J.Y. et Bouix M.**, 1980. Techniques d'analyse et de contrôles dans
les industries agro alimentaires , in analyse microbiologique 3 , la flore lactique par
Bourgeois C.M..
Edition *Technique et documentation , Lavoisier , Apria (Paris)* , pp : 232-331.
- 37- **Leveau J.Y. , Bouix M. et Deroissart H.**, 1991. Techniques d'analyse et de
contrôles dans les industries agro alimentaires , vol III .
2^{ème} édition , *Lavoisier Tec et Doc.*, pp : 170-173.
- 38- **Leveau J.Y. et Bouix M.**, 1993. Microbiologie industrielle ,
Edition *Lavoisier Tec et Doc.*, pp : 172-175.
- 39- **Medjouj H.**, 1993. Identification des bactéries lactiques , essai de détermination
du pouvoir acidifiant de quelques souches , mémoire d'ingénieur , institut INATA ,
université de Constantine , 143.
- 40- **Moris D.L.**, 1948 . Quantitative determination of carbohydrates with drey wood's
anthrone reagent .
Edition *science* , 05 Mars 1948 , pp : 107-255.

Références bibliographiques

- 41- **Nawoual Ait Abdel Ouahab** , 04-2001. Offices des publications universitaires ,
édition 1.04-4362, ISB.N : 9961.0.0518 , dépôt légal u52.2001 , pp : 11-84.
- 42- **Novel G.**, 1993. Les bactéries lactiques , microbiologie industrielle .
Edition *Lavoisier Tec et Doc.*, pp : 331-591.
- 43- **Orla Jensen** , 1924. Systématique des bactéries lactiques .
Edition *le loit* , pp : 2-45.
- 44- **Petranxienne E. et Lapied** , 1981. Qualité bactériologique du lait et produits
laitiers .
Edition *Lavoisier Tec et Doc* , pp : 17-18.
- 45- **Piletc H. , Bourdow J. et Toma B.** , 1979. Bactériologie médicale et vétérinaire :
systématique bactérienne .
Edition 2^{ème} édition , *Dion* (Paris) , pp : 235-244.
- 46- **Raemaekers M.H.H. et Vandamme J.**, 1997. Production of alternan sucrase by
Ln.mesenteroides NRRL , B-1355 in batch fermented : with controller pH and
dissolved oxygen J .
Edition *chem. Tech. biotechnol* , pp : 69- 478.
- 47- **Senez J.C.**, 1968. Microbiologie générale .
Edition *Doin* (Paris) , pp : 483-476.
- 48- **Sutra L., Federichi M. et Jouve Ji.L.** 1998 . Manuel de bactériologie ,
1^{ère} édition , pp : 2-249 .

Références bibliographiques

Web bibliographie :

49- <http://www.inraa.com/docs/01254-bl/bctr.html>

50- <file://A :vancomycine.wikipedia.htm>

51- www.stuba.sk

52- www.urm.sk. evolution of lactic and non microflora in brindza production. FEMS microbiologie rev 1993.

53- www.biolin.com

54- www.JMB.com. journal microb

55- [file://C:/nk/introduction aux techniques utilisées en biochimie.htm](file://C:/nk/introduction%20aux%20techniques%20utilisées%20en%20biochimie.htm)

Composition des Bouillons et géloses

Bouillon MRS :

- Peptone	10 g
- Extrait de viande	8 g
- Extrait de levure	4 g
- Glucose	20 g
- Tween 80	1 ml
- Phosphate dipotassique	2 g
- Acétate de sodium	5 g
- Citrate triammonique	2 g
- Sulfate de magnésium	2 g
- Sulfate de manganèse	0.05 g
- Eau distillée qsp	1000 ml

pH 6.2 , autoclaver 15 min à 120°C .

Gélose à lait écrémé :

- Lait écrémé
- Citrate de sodium
- Gélose blanche

Annexe 01

Gélose MRS modifiée :

10.5 M.R.S. + jus de tomate (ou de pomme).

- Glucose20 g
- Peptone10 g
- Extrait de bœuf8 g
- Extrait de levure4 g
- Phosphate de potassium, dibasique (KH₂PO₄)2 g
- Acétate de sodium · 3H₂O5 g
- Citrate d'ammonium2 g
- Sulfate de magnésium · 6H₂O 0,2 g
- Sulfate de manganèse · 4H₂O0,05 g
- "Tween 80" 1 ml
- Agar-agar 12 g
- Jus de tomate (ou de pomme ou de raisin)200 ml
- Eau jusqu'à1000 ml

pH 6.2 , autoclaver 15 min à 120°C .

Milieu Clark et Lubs : (acétoïne)

- Peptone tryptique10 g
- Phosphate bipotassique2 g
- Glucose10 g
- Eau distillée qsp1000 ml

pH 6.5 , stérilisation 15 min à 120°C .

Réaction de Voges Proskauer :

Permette de distinguer les aromatisants des acidifiants :



Annexe 01

Le diacétyl plus l'alpha naphanaphtol et un produit de décomposition de l'arginine dans le peptone donne une couleur rouge .

Milieu Gibson Abdel Malek :

- Extrait de levure	2.5 g
- Glucose	50 g
- Lait	50 ml
- Jus de tomate	100 ml
- Gélose nutritive ordinaire	200 ml

pH 6.5 , repartir en tubes de 8 à 10 ml .

Milieu hyper saccharosé :

- Extrait de viande	10 g
- Extrait de levure	3 g
- Bactrepeptone	2.5 g
- Saccharose	150 g
- K_2HPO_4	2 g
- NaCl	1g
- Agar	15 g
- Eau distillée qsp	1000 ml

pH 6.8 à 7 , stérilisation 20 min à 120°C .

Annexe 01

Milieu MEVAG sans sucre :

- Extrait de viande	3g
- Chlorure de potassium	5g
- Rouge de phénol	20 mg
- Agar	3g

Milieu Moeller :

- Peptone	5 g
- Extrait de viande	5 g
- Solution aqueuse de pourpre de bromocrésol à 2%	5 ml
- Rouge de crésol	5 mg
- Pyridoxal	0.005 g
- Glucose	0,5 g
- Eau distillée qsp	1000 ml

pH 6.4

Le milieu à l'arginine est obtenu en ajoutant 10 g d'arginine , la répartition est faite en tubes , stériliser 15 min à 120°C .

Colorants et Réactifs

Anthrone :

- Anthrone2 g
- H₂SO₄ (acide sulfurique) qsp100 ml

Bleu d'aniline :

- Bleu d'aniline1 g
- Ethanol10 ml
- Phénol2 g
- Eau distillée100 ml

Bleu de coomassie :

- Bleu de coomassie G25010 mg
- Ethanol à 95%5 ml
- Acide phosphorique à 85 %10 ml
- Eau distillée qsp1000 ml

Annexe 02

Catalase :

- Eau oxygénée 10 volumes.

Fushine de Ziehl :

- Fushine basique1 g
- Alcool éthylique à 90 %10 ml
- Phénol5g
- Eau distillée1000 ml

Lugol :

- Iode1g
- Iodure de potassium2g
- Eau distillée300 ml

Violet de gentiane :

- Violet de gentiane1g
- Ethanol à 90 %10 ml
- Phénol2g
- Eau distillée100 ml

Nom et prénom :
Khedimellah Nacira
Berkane Meriem
Sifouane Radia

Thème
Recherche , isolement et identification
de *Leuconostoc*

Date de soutenance :
09/07/2007
Encadreur :
M^r Kerdoun .N

Résumé

Le but de notre travail est d'étudier l'isolement , la caractérisation et l'identification du genre *Leuconostoc* à partir des trois substrats (LBEN, olives fermentés, viandes emballées sous vide) cette étude nous a permis d'avoir une collection de 9 souches représentées par 3 espèces appartenant au genre *Leuconostoc*.

L'étude de quelques mesures de croissance nous a permis de conclure la production de l'acide lactique qui se traduit par l'abaissement du pH, la production des protéines et la production des exo polysaccharides qui se traduit par la viscosité du milieu, ces métabolites qui présentent des intérêts technologiques peuvent également présenter des dommages aux industries et par voie conséquence à la santé des consommateurs.

Mots clés : *Leuconostoc* , protéines , exo polysaccharides , amines biogène .

Summary

The goal of our work is to study insulation the characterization and the identification of *Leuconostoc* kind has to start from three substrate (LBEN, olives ferment, meats pack vacuum) this study enabled us to have a collection of 9 stocks represented by 3 species belonging to the *Leuconostoc* kind.

The study of some measurements of growth us with licence to conclude the production from the lactic acid which results in the lowering of the pH, the production of the proteins and the production of the exo polysaccharides which results in the viscosity of the medium, these metabolites which present technological interests also can present damage at industries and by way consequence at the health of the consumers.

ملخص

الهدف من دراستنا هو العزل و التعرف على الخصائص المتعلقة بجنس *Leuconostoc* انطلاقا من ثلاث مواد (اللبن = الزيتون المخمر = اللحم المحفوظ بدون هواء) . هذه الدراسة سمحت لنا بالحصول على 09 سلالات ممثلة بثلاث أنواع تنتمي إلى جنس *Leuconostoc* .

دراسة بعض مقاييس النمو سمحت لنا باستنتاج تصنيع حمض اللبن المترجم بانخفاض pH ، تصنيع البروتينات و تصنيع متعدد السكاكر المترجم بلزوجة الوسط . هذه المواد الأيضية التي تمثل أهمية على المستوى الصناعي يمكن لها أيضا أن تظهر بعض الأخطار في الصناعات و بالتالي على صحة المستهلكين .