

الجمهورية الديمقراطية الشعبية الجزائرية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Laboratoire de Microbiologie Appliquée -LMA-



Thèse



Présentée Par

ZAROOUR Kenza

Pour l'obtention du diplôme de

Doctorat en Sciences

Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Thème

Etude de la diversité phénotypique, génotypique et aptitudes technologiques des souches de *Leuconostoc* isolées localement

Devant le jury :

Président : M. Miloud HEDDADJI

Prof. Université d'Oran 1

Examineur : M. Boumediene MOUSSA BOUDJEMAA

Prof. Université de Tlemcen

Examineur : M. Bouziane ABBOUNI

Prof. Université de Sidi Bel Abbès

Examineur : M. Zineb BENMECHERNE

Prof. Université d'Oran 1

Directeur : M. Mebrouk KIHAL

Prof. Université d'Oran 1

Co-directrice : Mme Paloma LÓPEZ GARCIA

Directrice de recherche (CIB, Espagne)

2017 – 2018

Effectuer une thèse de doctorat est comme faire une course de montagne, en définitive, c'est comme la vie elle-même condensée en très peu de temps, vous passez par un trouble d'humeur et un épuisement physique. Il y a des moments où vous allez avec un bon rythme et une bonne sensation en pensant que vous allez arriver rapidement à la fin, cependant, d'autres fois vous vous trouvez face à des faux résultats, à plusieurs répétitions et même, parfois, à un changement radical du plan de travail, mais à la fin, si vous ne jetez pas la serviette, vous atteignez toujours votre but avec un grand sourire et une grande satisfaction personnelle.

Tout au long de ma thèse de doctorat, j'ai eu des moments de rire et de grandes joies, mais aussi des moments de tristesse et de frustration. Avec l'expérience que j'ai acquise ces années, je changerais certaines choses, mais je n'aurais certainement pas regrandté le passage des certaines personnes, qui sans eux, je ne serais jamais la personne que je suis en ce moment. Maintenant, il est temps de leur dédier quelques mots de remerciements.

Zarour Kenza

Remerciement

Le premier de mes remerciements ira au bon Dieu miséricorde qui m'a donné la santé, le courage, la volenté et la patience pour réaliser ce travail.

Je remercie infiniment mon directeur de recherche, **Mebrouk Kihal**, Professeur et directeur de laboratoire de Microbiologie fondamentale et appliquée (LMA) à l'Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, de m'avoir encadrée et guidée dans des réflexions et des expériences scientifiques tout au long des années de DES, de Magister et de Doctorat, de m'avoir toujours sollicitée et de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire afin de réaliser une partie de ce travail de recherche. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa disponibilité, sa patience, son soutien tout en me laissant travailler très librement, en commençant par le choix de l'axe des exopolysaccharides. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

J'adresse mes sincères remerciements à ma co-directrice de thèse, **Paloma López Garía**, Docteur et directrice de laboratoire de Biologie Moléculaire des Bactéries à Gram Positif, au Centre de Recherches Biologiques (CIB) à Madrid, Espagne, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, j'y ai passé de très bons moments tant au niveau professionnel que relationnel. Merci également d'être venue à Oran, spécialement pour me soutenir et défendre le travail réalisé. Un merci très spécial, **Paloma**, de m'avoir intégrée dans tes projets de recherche comme un membre permanent de ton laboratoire, de m'avoir appris la précision, de m'avoir donnée ton temps, ta confiance, ton soutien durant les mois de travail, pour ta patience, ta rigueur, ton sens critique, tes conseils, tes encouragements et surtout pour ta disponibilité extraordinaire malgré la distance. Tu étais et tu resteras mon idole.

Je tiens aussi à remercier **M. Miloud HADDADJI**, Professeur à l'Université d'Oran 1, Ahmed Ben Bella, pour avoir bien voulu présider le jury de soutenance.

Je remercie grandement **M. Boumediene MOUSSA BOUDJAMAA**, Professeur à l'Université de Tlemcen, Abou Bakr Belkaid, de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail. Vos commentaires durant la soutenance me seront très utiles.

Je suis aussi très honoré que **M. Bouziane ABBOUNI**, Professeur à l'Université de de Sidi Bel Abbés, Djillali Liabes, ait accepté de juger mon travail. Soyez assuré de mon plus profond respect.

Je remercie vivement **Mme Zineb BENMECHERNENE**, Professeur à l'Université d'Oran 1, Ahmed Ben Bella, d'avoir acceptée de juger ce modeste travail.

Mes remerciements s'adressent également à tous mes collègues, particulièrement, aux **Dr. Fatima GHAZI** et **Pr. Kheira BELAHCEN** pour leur soutien durant ces dernières années.

Je tiens à remercier aussi mes amis de post-graduation du laboratoire de LMA, mon laboratoire en Espagne ainsi que tous les membres du laboratoire LBMB grâce auxquels ce travail était un vrai plaisir. Les bons moments que nous avons partagés resteront inoubliables. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite beaucoup de succès et de réussite.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail de recherche.

Je dédie ce travail

Aux êtes les plus chers à mon cœur dans ce monde, mes parents,

A celle qui a sacrifié tout ce qu'elle a de cher pour me prodiguer une éducation, un soutien, une assistance et un encouragement pour enfin devenir ce que je suis maintenant. Dieu merci

Ma chère mère

À mon amour, celui qui m'a toujours soutenu et était ma « force promotrice » pour étudier, travailler et aller plus loin avec plus de courage et persévérance, à qui j'éprouve un profond respect

Mon adorable père

À mon fiancé Yassine et ma belle-famille Bekenniche

À mes chères tentes Samia et Fatima Zohra

À mes chères sœurs Nourhane, Nadine, Israa, Anfal et Assia

À mes chers oncles, chères cousines et chers cousins

À mes chères sœurs et copines : Bahloul Halima, Rahli Fouzia, Beldjilali Asmaa, Adjouj Atika, Brahimi Samira, Baghdad Belhadj Fatima, Benaouli Hadjira, Khettou Amina et Rahim Ibtissem

À mes amis et collègues Boumehira Ali Zin Eddine et Djellilate Mohamed

À toute la famille Zarour, Benmoussa, Madani et Karouch sans exception

À tous ceux qui de près ou de loin, ont collaboré à la réalisation de ce travail

Zarour Kenza

Agradecimientos

Muchas son las personas que han estado conmigo a lo largo de la realización de la tesis, tanto en el ámbito personal como profesional y, sin lugar a duda, gracias a su apoyo incondicional y a su impecable trabajo, he llegado a la línea de meta con la sensación de haber hecho un buen trabajo.

Del grupo del centro de investigaciones biológicas (CIB) de Madrid, España, quiero agradecer, de corazón, su apoyo y cariño, a todas las personas que han participado y han hecho esta tesis posible.

Quiero expresar, primero, mi más sincero agradecimiento a mi co-directora de tesis, **Paloma López**, por acogerme en su laboratorio, creer en mí y enseñarme tanto. Gracias por darme mi primera oportunidad científica en el extranjero y hacerme sentir como una hija. Gracias también por venir a Orán, especialmente para apoyarme mientras defiendo el trabajo realizado. Agradecerte también, Paloma, de forma especial, el haberme integrado en tus proyectos de investigación como miembro permanente de tu laboratorio, por haberme enseñado la precisión, por darme tu tiempo, tu confianza, tu apoyo durante los meses de trabajo, por tu paciencia, tu rigor, tu sentido crítico, tus consejos y, sobre todo, por tu extraordinaria disponibilidad a pesar de la distancia.

De manera igualmente especial, quiero mostrar mi agradecimiento a **Gloria del Solar**, mi segunda jefa, la persona más sensible, afectuosa, cariñosa, gentil y honesta que conocido. Muchas gracias, Glorita, por tu atención, tu interés, tu generosidad tanto profesional como personal. Gracias por tu predisposición cuando te necesité y por dejarme usar tus equipos y tus materiales con tanta libertad siempre que los he precisado. Ha sido un placer trabajar contigo y te agradezco enormemente tu paciencia y dedicación.

Me siento inmensamente afortunada por haber tenido la oportunidad de trabajar con **Alicia Prieto** para elaborar el trabajo de caracterización de los exopolisacáridos. Muchas gracias por haber colaborado para que esta tesis salga adelante, por tu paciencia, tu comportamiento elegante, tus consejos y predisposición. No te puedes imaginar lo que te aprecio y las fuerzas que me has transmitido durante mi estancia en España.

Me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a **Maite Dueñas** y a **María Eugenia Muñoz** por su colaboración con la reología, por acogerme en su laboratorio de la facultad de Química, con quienes aprendí lo que es enseñar. Muchas gracias por sus correcciones, sus consejos y su disponibilidad.

También me gustaría mostrar mi agradecimiento a **Patricia Rúas Madiedo**, ya que trabajar y colaborar con ella era todo un sueño para mí. Muchas gracias por ser una muy buena profesional y tenderme la mano siempre, por tu dedicación a pesar de que estabas muy ocupada.

Gracias a todo el grupo de mi laboratorio 306, por su apoyo incondicional, las comidas, los paseos, las charlas, los consejos, las risas, las lágrimas, todo:

A **Mariluz**, que me recibió la primera vez en el laboratorio y me enseñó muchas cosas, gracias por tu paciencia, tu ayuda y tu colaboración.

A **Adrián**, mi amigo y mi “profesor de la lengua española”, que estuvo disponible para cualquier pregunta o ayuda. Gracias por tu paciencia, tu buen humor y porque siempre me sacas una sonrisa. Ha sido un placer conocerte, Adriancín, y mucha suerte en tu carrera.

A su novia **Nuria**, con quien compartí unos momentos agradables dentro y fuera del laboratorio. A pesar de que fue un período corto, pero siempre estaré agradecida por tu hospitalidad, tu apoyo, tu ayuda y nunca olvidaré lo que pasamos en Valencia. Muchas gracias querida.

A **Goretti**, mi amiga y mi compañera de todos los experimentos en los dos laboratorios, San Sebastián y Madrid. Muchas gracias por tu ayuda, querida, por tu paciencia, por saber escucharme cada vez que necesitaba hablar de mis malos momentos. Te deseo todo lo mejor porque tú lo mereces.

A **José**, gracias por estar siempre disponible para responder a mis preguntas y mis dudas y por haberme tratado de una manera muy respetuosa. Un placer haberte conocido.

A **Montse**, a quien le agradezco mucho su ayuda, su paciencia y, sobre todo, el compartir su experiencia, sus protocolos y sus datos conmigo. Ha sido un placer trabajar mano a mano contigo, Montse, para publicar un paper tan precioso.

A **Annel**, la persona más tranquila de México, gracias por tu disponibilidad, tu ayuda y tu apoyo tanto a nivel profesional como personal. Que tengas mucha suerte en tu vida y en tu carrera.

Asimismo, quiero agradecer a **Sofi, Ana, Celeste, Lorena y Víctor**. Pasé con vosotros muy buenos momentos, tanto profesionales como personales; gracias por vuestras conversaciones científicas y no científicas y por vuestros consejos. Espero veros pronto.

No puedo dejar de mencionar a **Pilar**, a la que le agradezco mucho por su valiosa y gran ayuda con las líneas celulares a lo largo de toda la tesis, por realizar un trabajo excelente y por estar siempre dispuesta a echar una mano.

Un agradecimiento muy especial a **Sara y su marido**, por su disponibilidad, su hospitalidad, su apoyo y su ayuda. Fue un placer conocerles y compartir con ellos momentos inolvidables en Madrid. Nunca os olvidaré.

Quiero agradecer también a: **Leonor** del servicio de cromatografía de gases, **Fernando** del servicio de microscopía electrónica, **Guillermo** del servicio de bioestadística, **Mariano**, mi compañero de la centrífuga, **Antonia** del servicio de limpieza, **Fernando**, el vigilante, y a toda la gente del servicio técnico y liofilización. Ha sido un placer conocerlos y trabajar con vosotros.

Por otro lado, quiero mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido en mayor o menor medida a la realización de esta tesis doctoral.



Gracia a todos

Kenza Zarour

La réalisation de ce travail a été possible grâce à l'aide du développement des thèses de doctorat dans le cadre du Programme National Exceptionnel Algérien PNE, financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique MESRS, au titre de l'année universitaire 2015-2016.

Ce travail a également été financé par une subvention du ministère de l'Économie et de la Compétitivité Espagnole pour la réalisation du projet du plan national « Développement et évaluation des aliments fonctionnels à base d'homopolysaccharides bactériens », sous la référence : AGL2015-65010-C3-1.

Sommaire

ملخص

Résumé

Resumen

Summary

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Bactéries lactiques

1- Généralités et habitat des bactéries lactiques 4

2- Classification et taxonomie 4

2-1- Genre *Leuconostoc* 5

2-2- Genre *Lactobacillus* 6

3- Physiologie et voies métaboliques centrales 6

3-1- Transport et métabolisme des sucres..... 7

4- Rôle des leuconostocs 16

4-1- Amélioration de la structure du fromage par la production du CO₂ 16

4-2- Utilisation des leuconostocs comme des levains d'arôme 16

4-3- Utilisation des leuconostocs pour éliminer certains défauts de goût 18

4-4- Utilisation des leuconostocs comme probiotiques 19

4-5- Production du mannitol 19

4-6- Hydrolyse des α -galactosides 20

4-7- Production des vitamines 20

4-8- Production des substances antimicrobiennes 20

4-9- Production des exopolysaccharides (EPS) 21

Chapitre II : Les exopolysaccharides

1- Généralités..... 22

2-	EPS produits par les BL	23
3-	Classification des EPS.....	25
3-1-	Homopolysaccharides (HoPS)	25
3-2-	Hétéropolysaccharides (HePS).....	30
4-	Détection et production des EPS.....	30
5-	Isolement, purification et caractérisation des EPS	32
5-1-	Isolement et Purification des EPS	32
5-2-	Composition des monomères et types des liaisons glycosidiques des EPS	34
5-3-	Fragmentation des EPS	35
5-4-	Spectroscopie RMN	36
5-5-	Détermination de la masse moléculaire	36
5-6-	Propriétés rhéologiques des EPS.....	37
6-	Applications des EPS	43
7-	Le dextrane et la dextrane-saccharase.....	44
7-1-	Le dextrane.....	44
7-2-	Dextrane-saccharase.....	45
7-3-	Production du dextrane.....	46
7-4-	Applications du dextrane.....	47
Matériel et méthodes		
1-	Provenance des échantillons.....	49
1-1-	Laits.....	49
1-2-	Fromage Bleu	49
1-3-	Ensilage	49
1-4-	Miel	49
2-	Bactéries utilisées	49
3-	Isolement et identification des isolats	50
3-1-	Préparation des échantillons.....	50
3-2-	Identification phénotypique.....	50

3-3-	Identification génotypique.....	54
4-	Activité protéolytique.....	56
5-	Activité lipolytique.....	56
6-	Utilisation du citrate	56
6-1-	Extraction d'ADN plasmidique (ADN _P).....	57
6-2-	Détection du gène <i>citP</i> partiel	57
7-	Cinétique d'acidification en milieu lait écrémé	58
7-1-	Mesure du pH	58
7-2-	Mesure de l'acidité titrable.....	58
8-	Profil protéique.....	59
8-1-	Extraction des protéines	59
8-2-	Electrophorèse SDS-PAGE.....	60
9-	Quantification des EPS.....	61
10-	Détection et localisation des EPS.....	63
10-1-	Au niveau macroscopique sur milieu solide	63
10-2-	Au niveau microscopique par microscope électronique de transmission	63
11-	Métabolisme du saccharose, production du glucose, fructose, mannitol, l'acide lactique et des EPS durant un suivi de la cinétique de croissance	63
12-	Analyse et caractérisation structurale des EPS	65
12-1-	Production et isolement.....	65
12-2-	Purification des préparations.....	65
12-3-	Analyse de la pureté des EPS.....	65
12-4-	Détermination de la masse moléculaire des EPS produits	66
12-5-	Détermination de la composition monomère	66
12-6-	Détermination du type de substitution : analyses de méthylation.....	67
12-7-	Spectre infrarouge	67
13-	Amplification et séquençage du gène responsable de la production des EPS	67
13-1-	Détection du gène partiel <i>dsr</i>	67
13-2-	Purification du produit de la PCR et séquençage.....	68

14-	Propriétés rhéologiques des EPS.....	68
14-1-	Détermination du comportement rhéologique.....	68
14-2-	Détermination de la concentration critique et le type des chaines	69
15-	Activité immunomodulatrice des EPS	70
15-1-	Préparation et conditions de culture de la lignée cellulaire THP-1	70
15-2-	Mesure de la cytotoxicité des EPS	70
15-3-	Montage de l'expérience par l'addition des EPS	71
15-4-	Détermination des niveaux de cytokines.....	72
16-	Formation des biofilms.....	72
17-	Effet probiotique	72
17-1-	Résistance à l'acidité.....	73
17-2-	Résistance aux sels biliaires	73
17-3-	Résistance à la pepsine	73
17-4-	Réponse au stimulus stomaco-duodéal	73
17-5-	Test d'hydrophobicité	74
17-6-	Résistance au phénol	74
17-7-	Test de la thermorésistance	74
17-8-	Antibiogramme.....	75
17-9-	Activité antimicrobienne	75
17-10-	Adhésion in vitro aux cellules Caco-2	76
18-	Essaie de la colonisation du poisson zèbre.....	78
18-1-	Description du modèle	79
18-2-	Préparation des échantillons et conditions de survie.....	80
18-3-	Essai de la colonisation	81
19-	Traitement bio-informatique des données.....	82
20-	Analyse statistique.....	83

Résultats

1-	Identification phénotypique.....	84
1-1-	Caractérisation macroscopique et microscopique	84
1-2-	Identification des isolats.....	86
2-	Identification génotypique.....	90
2-1-	Identification de l'espèce par le séquençage de ADNr 16S	90
2-1-	Identification de la sous-espèce.....	93
3-	Activité protéolytique.....	95
4-	Activité lipolytique.....	96
5-	Utilisation du citrate	97
5-1-	Détection du gène <i>CitP</i> partiel	97
6-	Cinétique d'acidification en milieu lait écrémé	98
7-	Profil protéique.....	100
8-	Quantification des EPS.....	103
9-	Détection des EPS au niveau macroscopique	105
10-	Localisation des EPS au niveau microscopique	107
11-	Métabolisme du saccharose, production du glucose, fructose, mannitol, l'acide lactique et des EPS durant un suivi de la cinétique de croissance	107
12-	Analyse et caractérisation structurale des EPS	112
12-1-	Isolement et purification des EPS	112
12-2-	Caractérisation structurale des EPS.....	114
13-	Gene <i>dsr</i> : Détection et séquençage.	119
13-1-	Profil plasmidique	119
13-2-	Détection des gènes <i>dsr</i> partiels	120
14-	Propriétés rhéologiques des dextrans obtenus	122
15-	Effet immunomodulateurs des dextrans sur les macrophages PMA-THP-1	126
15-1-	Effet des dextrans sur l'activité métabolique des macrophages.....	126
15-2-	Effet des dextrans sur la régulation de l'inflammation par les macrophages.....	127
16-	Formation des biofilms.....	130

17-	Aptitudes probiotiques des isolats.....	131
17-1-	Tolérance à l'acidité	131
2-1-	Tolérance aux sels biliaires	131
17-2-	Tolérance à la pepsine	132
17-3-	Réponse au stimulus stomaco-duodéal	132
17-4-	Test de l'hydrophobicité.....	132
17-5-	Résistance au phénol	132
17-6-	Thermorésistante	133
17-7-	Résistance aux antibiotiques	133
17-8-	Activité antimicrobienne	134
17-9-	Adhésion aux cellules Caco-2	136
17-10-	Détection de la colonisation bactérienne du poisson zèbre.....	139

Discussion

1-	Identification et typage des souches bactériennes.....	141
2-	Propriétés technologiques des souches de <i>Leuconostoc</i>	144
3-	Polysaccharides produits par les BL.....	150
4-	Propriétés probiotiques des souches de <i>L. mesenteroides</i>	160

Conclusion	172
-------------------------	-----

Références bibliographiques	175
--	-----

Annexes

ملخص

أظهرت نتائج التعريف المظهري والتحديد الوراثي لثمانية وعشرين بكتيريا معزولة من ست نظم إيكولوجية (حليب الإبل، حليب الماعز، حليب النعاج، الجبن الأزرق، الكأ والعسل)، أنهم ينتمون إلى سلالة *Lenconostoc mesenteroides*، سبعة عشر من منهم ينتمون إلى سلالة من نوع *mesenteroides*. أغلبية هذه البكتيريا أظهرت نشاطا ملحوظا في تفكيك بروتينات الحليب والدهون وأيضا في تخمر الحليب، بالإضافة إلى قدرتها على استعمال السترات التي بينت النتائج امتلاكها لجين *citpP* المشفر لسترات بريماز P، البروتين الأساسي لنقل السترات السيتوبلازم ليستهلك لاحقا. أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي للبروتينات الإجمالية للبكتيريا الممثلة لمختلف النظم الإيكولوجية، تشابه في التحليل البروتيني مع معدل يتراوح بين 85% و100%. كشفت دراسة إنتاج المركبات السكرية الخارجية، بوجود 2% من السكروز، مستويات إنتاج مختلفة (بين $0,55 \pm 0,17$ غ ل⁻¹ و $0,18 \pm 3,52$ غ ل⁻¹). وفقا لمعدلات الإنتاج هذه وخصائص بيو تكنولوجية أخرى، ثلاثة بكتيريا من سلالة *L. mesenteroides* (CM9، CM30 و SM34)، المعزولة من حليب الخام الجزائري، تم اختيارها لإنتاج وتنقية سكرياتها الخارجية من طافليات وسط النمو البكتيري وذلك باستعمال الإيثانول، وتقنية الدياليز مع ذلك. أيضا عملية التلجيد المستعملة لاحقا سمحت بحفظ هذه المركبات في درجة حرارة معتدلة لتستعمل على شكل محاليل. هذه السكريات تمت مقارنتها مع السكريات الخارجية المنتجة من طرف البكتيريا من سلالة *L. mesenteroides* RTF10 و MN1 *Lb. sakei*، المعزولة من منتجات اللحوم الإسبانية. كشف التحليل الميثيلي وتحديد المركبات الجزئية المكونة للسكريات أنها مركبات سكرية متجانسة ومتماثلة من نوع ديكستران، مكون من سلسلة رئيسية من وحدات جلوكوبيرانوز مربوطة بسلسلة من فئة α -(6،1) ومتفرعة جزئيا في وضعية 3-O بوحدة واحدة من نوع α -جلوكوبيرانوز مع نسبة تتراوح بين 8،5% و10،3%. أظهرت كروماتوغرافيا الاستبعاد مع تحليل تشتت الضوء بالليزر متعدد الأقطاب أن الديكستران له كتلة مولية تتراوح بين $1,74 \times 10^8$ دالتون و $4,41 \times 10^8$ دالتون. كشف التحليل الريولوجي للمحاليل المائية لكافة الديكسترانات أن لها سلوك شبه بلاستيكي، تحت ظروف احتكاك دوراني، مع بنية على شكل لفائف عشوائية ومرنة. أظهرت أيضا الديكسترانات، تحت نفس الظروف، اختلافا في اللزوجة والتي زادت مع تزايد التركيز. كشفت الدراسة الأيضية للخمس بكتيريا المنتجة للدكستران وأيضا البكتيريا الغير منتجة من سلالة *L. mesenteroides* CM70 في وجود السكروز كمصدر وحيد الكربون، وجود علاقة وطيدة بين استهلاك السكروز، كمادة أساسية وأولية، و إنتاج الديكستران، مع وجود اختلاف في وتيرة طرح نواتج الأيض الوسطية (الجلوكوز و الفركتوز) و النهائية (الحمض اللبني و المانيتول) لكافة البكتيريا و فقا لمسارات التمثيل الغذائي الخاصة بها. بالإضافة إلى ذلك، فإن الديكسترانات، التي تمت تنقيتها عن طريق كروماتوغرافيا

الاستبعاد، قدرة على تعديل مناعة الخلايا البلعومية الإنسانية 1-THP-PMA، مخبريا، وذلك بتحديد جزئي للتأثير الالتهابي للسكريات الدهنية B4:O111 *Escherichia coli*، وقد أجري هذا الاختبار بعد تقييم السمية الخلوية لهذه المركبات الخاضعة للتجريب. والتي اشارت إلى عدم وجود أي تأثير سمي على النشاط الأيضي للخلايا الأحادية المتباينة للسلالة الخلوية THP-1. ان استعمال تقنية PCR وترتيب المتواليات الجينية أدى إلى كشف أن جميع البكتيريا المعزولة تمتلك الجين *dsr*، المشفر لانزيم دكستران- سكران، المسؤول عن انتاج الديكستران. خلال فترة حضانة طويلة في وسط نمو صلب يحتوي على السكروز، أظهرت البكتريا المنتجة للدكستران مظهرين مختلفين، لا علاقة لهما لا بنوع ولا بالسلالة التي ينتمون إليها. السلالات البكتيرية MN1 *Lb. sakei* و CM9 *L. mesenteroides* شكلت تجمعات بكتيرية مخاطية مستقرة و مدمجة، في حين تجمعات البكتيريا الثلاثة المتبقية ظهرت على شكل سائل منتشر بعد 72 ساعة من الحضانة. هذا السلوك التفاضلي، قد تمت ملاحظته في قدرة البكتريا، السابق ذكرها، على الالتصاق مع خلايا Caco-2. البكتريا المشكلة للتجمعات البكتيرية المخاطية المدمجة أظهرت مستوى عال من الالتصاق عند استزراعها في وجود الجلوكوز، من ناحية أخرى، هذا المستوى انخفض في وجود السكروز (شرط مطلوب لإنتاج الديكستران)، في حين لم يتم الكشف عن أي تأثير من مصدر الكربون لقدرة الالتصاق للبكتريا الأخرى من سلالة *L. mesenteroides*، التي أظهرت مستويات متغيرة من الارتباط مع خلايا ظهارة الأمعاء. إن البكتريا من سلالة *L. mesenteroides* CM70، CM30، و خاصة CM9، أظهرت خصائص بروبوتيكية نظرا لقدرتها على مجابهة صعوبة البقاء في الجهاز الهضمي، مقاومة المضادات الحيوية و أنشطتها المضادة للمكروبات ضد سلالة *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و *E. coli* ATCC 25922. بالإضافة، البكتريا CM9، هي البكتريا الوحيدة التي أظهرت أفضل مستوى استعمار، في الجسم الحي، لأمعاء يرقات السمك المعزولة والنقية من سلالة الزيبيرا.

كلمات المفتاح: بكتيريا لبنية، *Leuconostoc mesenteroides*، تعريف بكتيري، خصائص تكنولوجية، مركبات سكرية خارجية، دكستران، خصائص ريولوجية، تعديل المناعة، التصاق، بروبوتيك، سمك الزيبيرا.

Résumé

L'identification phénotypique et génotypique des vingt-huit souches isolées des six écosystèmes (lait de chamelle, lait de chèvre, lait de brebis, fromage bleu, ensilage et miel) ont montré qu'elles appartiennent à l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* dont dix-sept entre elles appartiennent à la sous-espèce *mesenteroides*. La plupart de ces souches ont montré une activité protéolytique, lipolytique et acidifiante importante, en plus de leur capacité à métaboliser le citrate dont la réaction en chaîne par polymérase (PCR) a montré leur possession du gène *citP* codant pour la citrate perméase P, et par conséquent, un métabolisme postérieur de ce composé. L'électrophorèse des protéines totales des souches de *L. mesenteroides* représentatives des différents écosystèmes a montré la ressemblance des profils protéiques avec un taux de similitude variant entre 85% et 100%. L'étude de la production des exopolysaccharides (EPS), en présence de 2% de saccharose, a révélé des niveaux de production variables (entre $0,55 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1}$ et $3,52 \pm 0,18 \text{ g L}^{-1}$). Selon ces taux de production et autres propriétés technologiques, les trois souches de *L. mesenteroides* (CM9, CM30 et SM34), isolées à partir de laits de mammifères algériens, ont été sélectionnées pour produire et purifier leurs EPS à partir de surnageants de culture bactérienne par précipitation à l'éthanol et par une dialyse postérieure. En plus, leur lyophilisation ultérieure a permis de les maintenir à une température ambiante pour une utilisation subséquente en suspension. Ces EPS ont été comparés avec ceux produits par les souches de *L. mesenteroides* RTF10 et de *Lactobacillus sakei* MN1, isolées des produits carnés espagnols. L'analyse de la méthylation et la détermination de la composition des monomères des EPS ont révélé que les EPS sont des homopolysaccharides de type dextrans avec une chaîne principale d'unités de glucopyranose liées par des liaisons α -(1,6) et partiellement ramifiées dans la position O-3 par une seule unité α -glucopyranose avec un pourcentage qui varie entre 8,5 % et 10,3%. La chromatographie d'exclusion associée à une analyse de détection de diffusion de lumière laser multiangle a démontré que les dextrans ont des masses moléculaires comprises entre $1,74 \times 10^8 \text{ Da}$ et $4,41 \times 10^8 \text{ Da}$. L'analyse rhéologique des solutions aqueuses du polymère a révélé que tous avaient un comportement pseudo-plastique dans des conditions de cisaillement et une structure de bobine aléatoire et flexible. Les dextrans ont montré, sous cisaillement, une différence de viscosité, qui accroissait à mesure que la concentration augmentait. L'étude métabolique, en présence de saccharose en tant que seule source de carbone, des cinq souches productrices des dextrans ainsi que la souche, non productrice, *L. mesenteroides* CM70 a montré une corrélation entre la

consommation de substrat principal et la synthèse des dextrans dans les souches productrices des EPS, ainsi qu'une différence dans le profil de production de leurs métabolites intermédiaires (fructose et glucose) et finaux (l'acide lactique et le mannitol) chez toutes les souches, selon leurs voies métaboliques. En outre, les dextrans, purifiés par chromatographie d'exclusion, étaient capables de immunomoduler des macrophages humains PMA-THP-1, *in vitro*, neutralisant partiellement l'effet inflammatoire du lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* O111:B4. Ce test a été réalisé après l'évaluation de la cytotoxicité des polymères mises en test, qui n'a indiqué aucun effet toxique sur l'activité métabolique des monocytes différenciées de la lignée cellulaire THP-1. La détection par PCR et le séquençage du fragment amplifié ont indiqué que toutes les souches isolées possèdent le gène *dsr* codant pour l'enzyme dextrane-saccharase, responsable de la production de dextrane. Pendant une incubation prolongée sur un milieu solide contenant du saccharose, les bactéries productrices de dextrane présentaient deux phénotypes distincts non liés au genre ou aux espèces auxquels elles appartenaient. Les souches de *L. mesenteroides* CM9 et *Lb. sakei* MN1 ont formé des colonies mucoïdes et compactes, alors que les colonies des trois autres souches de *Leuconostoc* sont devenues diffuses après 72 h d'incubation. Ce comportement différentiel a également été observé dans la capacité des souches correspondantes à se lier aux cellules Caco-2. Les souches formant des colonies mucoïdes compactes ont montré un niveau élevé d'adhésion lorsqu'elles ont été cultivées en présence de glucose, par contre, il a diminué en présence de saccharose (condition requise pour la synthèse du dextrane). Cependant, aucune influence de la source de carbone n'a été détectée pour la capacité d'adhésion pour les autres souches de *L. mesenteroides*, qui ont montré des niveaux variables de liaison aux entérocytes. Les souches de *L. mesenteroides* CM30, CM70 et en particulier CM9 ont présenté des propriétés probiotiques vu leurs capacités à résister aux conditions de stress du tractus gastro-intestinal, leurs profils d'antibiogramme et leurs activités antimicrobiennes contre *S. aureus* ATCC 25923 et *E. coli* ATCC 25922. En outre, *L. mesenteroides* CM9 a montré le meilleur profil de colonisation, *in vivo*, de l'intestin des larves gnotobiotiques de poisson zèbre.

Mots clés : bactéries lactiques, *Leuconostoc mesenteroides*, typification bactérienne, propriétés technologiques, exopolysaccharides, dextrane, propriétés rhéologiques, immunomodulation, adhésion, probiotique, poisson zèbre.

Resumen

La identificación fenotípica y genotípica de veintiocho cepas aisladas de seis ecosistemas (leche de camella, leche de cabra, leche de oveja, queso azul, ensilado y miel) mostraron que pertenecen a la especie *Leuconostoc mesenteroides* y que diecisiete de ellas pertenecen a la subespecie *mesenteroides*. La mayoría de estas cepas mostraron una actividad proteolítica, lipolítica y acidificante significativa, además de su capacidad para metabolizar el citrato. Esta última característica fue correlacionada con la detección por PCR del gen *citP* que codifica la citrato permeasa P, proteína indispensable para el transporte del citrato al citoplasma y consecuentemente para su posterior metabolización. La electroforesis de las proteínas totales de las cepas de *L. mesenteroides* representativas de los diferentes ecosistemas mostró la similitud de los perfiles proteicos con un porcentaje de homología que varió entre el 85% y el 100%. El estudio de la producción de exopolisacáridos (EPS), en presencia de sacarosa al 2%, reveló niveles de producción variables (entre $0,55 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1}$ y $3,52 \pm 0,18 \text{ g L}^{-1}$). Teniendo en cuenta la eficiencia de producción de los EPS y otros factores tecnológicos, se seleccionaron tres cepas de *L. mesenteroides* (CM9, CM30 y SM34), aisladas a partir de leches de mamíferos argelinos, para producir y purificar sus EPS a partir de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos mediante precipitación con etanol y posterior diálisis. Además, su posterior liofilización permitió mantenerlos a temperatura ambiente para su ulterior utilización por suspensión. Estos EPS se compararon con los producidos por las cepas de *L. mesenteroides* RTF10 y *Lactobacillus sakei* MN1 aisladas de productos cárnicos españoles. El análisis de la metilación y la determinación de la composición de los monómeros reveló que los EPS son homopolisacáridos del tipo dextrano con una cadena principal de unidades de glucopiranososa α -(1,6) y parcialmente ramificadas en la posición O-3 por una única unidad de α -glucopiranososa con un porcentaje que variaba entre el 8,5% y el 10,3%. Cromatografía de exclusión combinada con un análisis de dispersión de luz láser multiángulo demostró que los dextranos tenían masas moleculares entre $1,74 \times 10^8 \text{ Da}$ y $4,41 \times 10^8 \text{ Da}$. El análisis reológico de las soluciones acuosas de estos polímeros reveló que todas tenían comportamiento pseudoplástico bajo condiciones de cizalla y una estructura de espiral enrollada al azar y flexible. Los dextranos mostraron, bajo cizalla, una diferencia de viscosidad, que aumentó a medida que aumentaba la concentración. El estudio metabólico, en presencia de sacarosa como única fuente de carbono, de cinco cepas productoras de dextranos y la cepa no productora *L. mesenteroides* CM70 mostró una

correlación entre el consumo de sacarosa, sustrato primario y la síntesis de los dextranos en las cepas productoras y una diferencia en el perfil de producción de los metabolitos intermedios (fructosa y glucosa) y finales (ácido láctico y manitol) en todas las cepas, dependiendo de sus rutas metabólicas. Además, los dextranos purificados por cromatografía de exclusión, fueron capaces de inmunomodular *in vitro* los macrófagos humanos PMA-THP-1, neutralizando parcialmente el efecto inflamatorio del lipopolisacárido de *Escherichia coli* O111: B4. Este ensayo se llevó a cabo después de la evaluación de la citotoxicidad de los polímeros estudiados, que no indicó ningún efecto tóxico sobre la actividad metabólica de las células THP-1. La detección por PCR y la secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados indicó que todas las cepas poseen un gen *dsr* que codifica una dextransacarasa, enzima responsable de la producción del EPS. Durante la incubación prolongada en un medio sólido que contiene sacarosa, las bacterias productoras del dextrano mostraron dos fenotipos distintos no relacionados con el género o la especie a la que pertenecían. Las cepas de *L. mesenteroides* CM9 y *Lb. sakei* MN1, formaron colonias mucosas y compactas, mientras que las colonias de las otras tres cepas de *Leuconostoc* se volvieron difusas después de 72 h de incubación. Este comportamiento diferencial también se observó en la capacidad de las cepas correspondientes para unirse a células Caco-2. Las cepas que formaban colonias mucosas y compactas mostraron un alto nivel de adhesión cuando se cultivaron en presencia de glucosa, que se redujo en presencia de sacarosa (condición requerida para la síntesis del dextrano). Sin embargo, no se detectó influencia de la fuente de carbono sobre la capacidad de adhesión de las otras cepas de *L. mesenteroides*, que mostraron niveles variables de unión a enterocitos. Las cepas CM30, CM70 y particularmente CM9 mostraron unos perfiles probióticos significativos teniendo en cuenta sus capacidades para resistir las condiciones de estrés del tracto gastrointestinal, sus perfiles de resistencia a antibióticos y sus actividades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922. Además, *L. mesenteroides* CM9 fue la cepa que mostró, *in vivo*, el mejor patrón de colonización del intestino de larvas gnotobióticas del pez cebra.

Palabras clave: bacterias lácticas, *Leuconostoc mesenteroides*, tipificación bacteriana, propiedades tecnológicas, exopolysacáridos, dextrano, propiedades reológicas, inmunomodulación, adhesión, probióticos, pez cebra.

Summary

The phenotypic and genotypic identification of twenty-eight strains isolated from six ecosystems (camel, goat and sheep milks, blue cheese, silage and honey) showed that they belong to the species *Leuconostoc mesenteroides*, seventeen of them belong to the subspecies *mesenteroides*. Most of these strains showed significant proteolytic, lipolytic and acidifying activities, in addition to their ability to metabolize citrate. This last property was assessed by PCR detection of the *citP* gene, which encodes the citrate permease P, protein indispensable for citrate transport and consequently further metabolism of this compound. Electrophoretic analysis of the total proteins of *L. mesenteroides* strains from the different ecosystems showed a similarity with a homology ranging from 85% to 100%. The analysis of exopolysaccharides (EPS) production, in the presence of 2% sucrose, revealed variable levels (from 0.55 ± 0.17 g L⁻¹ to 3.52 ± 0.18 g L⁻¹). Taking into account these production rates and other technological properties, the three strains of *L. mesenteroides* (CM9, CM30 and SM34), isolated from algerian mammalian milks, were selected to produce and purify their EPS from bacterial culture supernatants by ethanol precipitation and by dialysis. In addition, their subsequent freeze-drying allowed them to be maintained at room temperature for subsequent use in suspension. These polymers were compared with those produced by *L. mesenteroides* RTF10 and *Lactobacillus sakei* MN1 isolated from spanish meat products. Methylation analysis and determination of the composition of monomers revealed that the EPS are dextran-type homopolysaccharides with a main chain of α -(1,6) and partially branched glucopyranose units in the O-3 position by a single α -glucopyranose unit with a percentage which ranged from 8.5% to 10.3%. Exclusion chromatography combined with multiangle laser light scattering analysis demonstrated that the dextrans had molecular masses between 1.74×10^8 Da and 4.41×10^8 Da. Rheological analysis of the aqueous solutions of the polymer revealed that all EPS had pseudoplastic behavior under shear conditions and a random and flexible coil structure. Under shearing conditions, dextrans showed differences in viscosity, which increased as the concentration augmented. The metabolic study of five dextran-producing strains as well as the non-productive strain *L. mesenteroides* CM70, in the presence of sucrose as the sole carbon source, showed a correlation between main substrate consumption and dextran synthesis for the producers, and a difference in the levels of the intermediate (fructose and glucose) and final metabolites (lactic acid and mannitol) in all strains, according to their metabolic pathways.

In addition, the dextrans, purified by exclusion chromatography, could immunomodulate, *in vitro*, the human macrophages PMA-THP-1, counteracting partially the inflammatory effect of the *Escherichia coli* O111: B4 lipopolysaccharide. This test was carried out after the evaluation of the cytotoxicity of the EPS, which indicated no toxic effect of the dextrans on the metabolic activity of the THP-1 cell line. PCR detection and sequencing of the amplified DNA fragments indicated that all strains possess a *dsr* gene encoding a dextransucrase enzyme, responsible for the EPS production. During prolonged incubation on a sucrose-containing solid medium, the dextran-producing bacteria had two distinct phenotypes unrelated to the genus or the species to which they belonged. *L. mesenteroides* CM9 and *Lb. sakei* MN1 formed compact and mucoid colonies, while the colonies of the other three strains of *Leuconostoc* became diffuse after 72 h. This differential behavior was also observed in the ability of the corresponding strains to bind to Caco-2 cells. The strains forming compact and mucoid colonies showed a high level of adhesion when cultured in the presence of glucose. On the other hand, it decreased in the presence of sucrose (a condition required for the synthesis of dextran). However, no influence of the carbon source was detected for the adhesion capacity of the other strains of *L. mesenteroides*, which showed variable levels of enterocyte binding. *L. mesenteroides* CM30, CM70 and in particular CM9 strains showed probiotic properties due to their ability to withstand the conditions of stress of the gastrointestinal tract, their antibiogram profiles and their antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 25922. In addition, *L. mesenteroides* CM9 showed, *in vivo*, the best pattern of intestine colonization of gnotobiotic zebrafish larvae.

Keywords: lactic bacteria, *Leuconostoc mesenteroides*, bacterial typing, technological properties, exopolysaccharides, dextran, rheological properties, immunomodulation, adhesion, probiotic, zebrafish.

Liste des abréviations

$\dot{\gamma}$	Taux de cisaillement
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN_G	Acide désoxyribonucléique génomique
ADN_p	Acide désoxyribonucléique plasmidique
ARN	Acide ribonucléique
ARNase	Ribonucléase
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNr 16S	Sous-unité 16S de l'ARN ribosomique
BL	Bactéries lactiques
C*	Concentration critique des molécules de dextrane
CDMS	Milieu défini CDM supplémenté de 0,8% de saccharose
CDMG	Milieu défini CDM supplémenté de 0,8% de glucose
CIB	Centro de Investigaciones Biológicas
Cm	Chloramphénicol
C-terminal	Extrémité carboxyle terminale
DMEM	Milieu Dulbecco's Modified Eagle
EC	Commission des enzymes
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments
EPS	Exopolysaccharide
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FS	Fructane-saccharase
GH	Glycoside hydrolase
GRAS	Généralement reconnu comme étant sécurisé
GS	Glucane-saccharase
GT	Glycosyltransférase
HePS	Hétéropolysaccharides
HoPS	Homopolysaccharides
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance

hpf	Heure post-fécondation
IL-10	Interleukine 10
LPS	Lipopolysaccharide de <i>Escherichia coli</i> O111:B4
MH	Miller-Hinton
MRS	de Man Rogosa Sharpe
MSEV	Mayeux, Sandine et Elliker supplémenté de la vancomycine
N-terminal	Extrémité amino terminale
η	Viscosité apparente
η_0	Viscosité Newtonienne
OXA	Oxaloacétate
PBS	Tampon phosphate salé
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMA-THP-1	THP-1 monocytes différenciés aux macrophages avec PMA
PTS	système phosphotransférase
QPS	Présomption d'innocuité reconnue
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rpm	Révolution par minute
SEC	Chromatographie d'exclusion
SEC-MALLS	Chromatographie d'exclusion couplée à une détection de dispersion de lumière laser multi-angle
t.a	Température ambiante
TEM	Microscope électronique à transmission
TNF-α	Facteur de nécroses tumoral α
ufc	Unité formant colonie

Liste des figures

Figure 1. Métabolisme du lactose chez <i>L. mesenteroides</i>	9
Figure 2. Voies métaboliques centrales de divers sucres chez <i>L. mesenteroides</i>	10
Figure 3. Principales étapes du métabolisme du citrate et production des substances responsables d'arôme chez <i>Leuconostoc</i>	13
Figure 4. Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif.	22
Figure 5. Colonie de <i>P. parvulus</i> 2.6R, productrice de EPS	24
Figure 6. Structures de base des α -glucanes (dextrane, mutane, alternane et reuterane) synthétisés par les glucane-saccharases.	27
Figure 7. Trois types de réactions catalysées par les glucane-saccharases	29
Figure 8. Stratégie générale de l'analyse des polysaccharides extracellulaires produits par les BL.....	33
Figure 9. Comportement de viscosité newtonienne et pseudo-plastique en fonction du taux de cisaillement.....	38
Figure 10. Comportement pseudo-plastique des solutions de polymères illustré par la viscosité en fonction de taux de cisaillement.	40
Figure 11. Viscosité en fonction de différentes concentrations des solutions du polymère. ...	42
Figure 12. Courbe d'étalonnage de D-glucose.	62
Figure 13. Viscoélastomètre Termo-Haake Rheostress I.....	69
Figure 14. Cycle de vie du poisson zèbre.....	80
Figure 15. Observation macroscopique des colonies de la souche CM30, cultivée sur milieu solide MRS.....	84
Figure 16. Observation au microscope optique de la forme des cellules et leur mode d'association de la souche CM30.....	85
Figure 17. Observation au microscope électronique à transmission de de la souche CM30 ...	85
Figure 18. Production du gaz à partir du glucose de la souche CM9.....	86
Figure 19. Incapacité des souches à hydrolyser l'arginine sur milieu M16BCP.	86
Figure 20. Profil fermentaire de la souche CM9	87
Figure 21. Profil fermentaire de la souche CM30 testée sur une galerie API 50 CHL.....	89
Figure 22. Aspect des colonies des souches de <i>Leuconostoc</i> sur milieu MSE	89
Figure 23. Incapacité de la souche CM9 à produire l'acétoïne	90
Figure 24. Analyse de l'ADN _G des souches indiquées sur gel d'agarose à 0,8%.....	90

Figure 25. Analyse du produit de PCR du gène codant l'ARN 16S des souches indiquées sur gel d'agarose à 0,8%.	91
Figure 26. Arbre phylogénétique des souches du gène codant pour l'ARNr 16S des souches en utilisant la méthode Neighbor-Joining.	92
Figure 27. Analyse du produit de PCR du gène spécifique de <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> des souches indiquées sur gel d'agarose à 1%..	93
Figure 28. Activité protéolytique des souches de <i>L. mesenteroides</i> sur milieu PCA + 3% de lait écrémé.	95
Figure 29. Mise en évidence de l'activité lipolytique des souches de <i>L. mesenteroides</i> sur milieu MRS+ 3% d'huile d'olive.	96
Figure 30. Utilisation de citrate par les souches de <i>L. mesenteroides</i> sur milieu KMK.	97
Figure 31. Analyse du produit de PCR sur gel d'agarose à 1% du gène partiel <i>citP</i> présent chez les souches <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> CM9 et CM70, <i>W. paramesenteroides</i> J1 et <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CRL 264.....	98
Figure 32. Cinétique d'acidification, diminution du pH (A), d'évolution de l'acidité dornic (B), des souches de <i>L. mesenteroides</i> CM9, GM2, SM34, F9, E14 et M67, dans milieu lait écrémé avec 0.3% d'extrait de levure.	99
Figure 33. Analyse des protéines totales par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des souches de <i>L. mesenteroides</i> isolées de différents écosystèmes.	100
Figure 34. Analyse des protéines totales des souches de <i>L. mesenteroides</i> précédemment fractionnées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS.....	101
Figure 35. Phénogramme de similitude entre les souches de <i>L. mesenteroides</i> isolées de différents écosystèmes.....	103
Figure 36. Production des EPS des souches de <i>L. mesenteroides</i> sur milieu CDMS	104
Figure 37. Détection et évolution de la production des EPS par BL cultivées en plaques en présence du saccharose.....	106
Figure 38. Localisation au niveau cellulaire de la production des EPS des souches <i>L. mesenteroides</i> CM9 par MET.	107
Figure 39. Analyse du métabolisme du saccharose et de la production EPS des souches de <i>L. mesenteroides</i> SM34, CM30 et CM9.....	110
Figure 40. Analyse du métabolisme du saccharose et de la production EPS des souches de <i>L. mesenteroides</i> CM70, RTF10 et <i>Lb. sakei</i> MN1..	111
Figure 41. Chromatographie d'exclusion des EPS CM9, EPS CM30 et EPS SM34.....	114
Figure 42. Composition de monosaccharides de EPS CM9.....	115

Figure 43. Spectre infrarouge des EPS CM9, EPS CM30 et EPS SM34.....	115
Figure 44. Types des liaisons des EPS analysés par méthylation	116
Figure 45. Structure générale des EPS analysés.	117
Figure 46. Chromatogrammes des masses moléculaires des EPS commerciaux et naturels analysés par SEC-MALLS.	118
Figure 47. Profil plasmidique des souches de <i>Leuconostoc</i>	119
Figure 48. Détection par PCR les gènes dsr.....	120
Figure 49. Arbre phylogénétique des séquences partielle du gène dsr des BL.....	121
Figure 50. Viscosité apparente en fonction des taux de cisaillements des dextrans produits par les BL.	123
Figure 51. Viscosité Newtonienne en fonction des concentrations des cinq dextrans.....	125
Figure 52. Viscosité des solutions aqueuses des dextrans à 3%.....	126
Figure 53. Test de cytotoxicité XTT des macrophage PMA-THP-1 traités par le dextrane produit par <i>L. mesenteroides</i> CM9.	127
Figure 54. Différenciation des monocytes en macrophages par l'addition de 40 nM de PMA.	128
Figure 55. Influence des dextrans sur la production des cytokines produites par les macrophages PMA-THP-1 stimulés par LPS (<i>E. coli</i> O111:B4).....	129
Figure 56. Détection de la formation des biofilms en présence du glucose et du saccharose des souche de <i>L. mesenteroides</i> CM9, CM30 et CM70 et <i>Lb. sakei</i> MN1.....	130
Figure 57. AntibioGramme de la souche CM9 vis-à-vis cinq antibiotiques.....	134
Figure 58. Inhibition bactérienne par les souches de <i>L. mesenteroides</i> CM9 et CM70.....	136
Figure 59. Sélection de la substance inhibitrice de nature protéique produite par <i>L. mesenteroides</i> CM70.....	136
Figure 60. Différenciation des cellules Caco-2 en monocouche.....	137
Figure 61. Adhésion des souches des BL aux cellules Caco-2.	138
Figure 62. Adhésion de <i>Lb.sakei</i> MN1 [pCR12] sur les cellules intestinales Caco-2 après 1 h incubation à 37 °C avec le microspore multiinvivo.	138
Figure 63. Etapes de développement du poisson zèbre utilisé dans l'expérience de colonisation	139
Figure 64. Colonisation des larves du poisson zèbre par les souches de <i>L. mesenteroides</i> dans le tube digestif.....	140

Liste des tableaux

Tableau 1. Différents types des homopolysaccharides produits par les BL.....	28
Tableau 2. Codes des bactéries isolées à partir de six écosystèmes différents	50
Tableau 3. Composition des gels de séparation et de concentration.....	60
Tableau 4. Composition des solutions de coloration, décoloration rapide et lente.....	61
Tableau 5. Évaluation de la résistance aux contraintes thermiques, osmotiques et acides de quelques souches isolées à partir des différents écosystèmes	88
Tableau 6. Profil fermentaire de de quelques souches isolées à partir des différents écosystèmes	88
Tableau 7. Identification des souches sélectionnées	91
Tableau 8. Résumé de l'identification phénotypique et génotypique des souches de <i>Leuconostoc</i> isolées à partir de différents écosystèmes	94
Tableau 9. Activité protéolytique de certaines souches de <i>L. mesenteroides</i> isolées à partir de différents écosystèmes.....	95
Tableau 10. Mise en évidence de l'activité lipolytique de certaines souches de <i>L. mesenteroides</i> isolées à partir de différents écosystèmes	96
Tableau 11. Matrice des coefficients de similarité (%) entre chaque deux souches de <i>L. mesenteroides</i>	102
Tableau 12. Analyse du degré de pureté des EPS isolées de souches sélectionnées	113
Tableau 13. Analyse de méthylation des EPS des <i>L. mesenteroides</i> CM9, CM30 et SM34.	116
Tableau 14. Masse moléculaire des dextrans analysés.....	117
Tableau 15. Données extraites de la relation directe entre la viscosité Newtonienne et les concentrations utilisées	124
Tableau 16. Influence de l'acidité, la présence des sels biliaires et la pepsine sur le pourcentage de survie des souches de <i>L. mesenteroides</i>	131
Tableau 17. Influence du stimulus gastro-intestinal, d'hydrophobicité et de la présence du phénol sur le pourcentage de survie des souches de <i>L. mesenteroides</i>	133
Tableau 18. Effet de la thermorésistance sur la croissance des souches des <i>L. mesenteroides</i>	133
Tableau 19. Résultats du test de sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>L. mesenteroides</i>	134

Tableau 20. Diamètres d'inhibition des souches pathogènes par les souches de <i>L. mesenteroides</i> obtenus par la méthode directe et indirecte.	135
--	-----

Introduction

Les bactéries lactiques (BL) représentent un groupe hétérogène de souches de différents genres appartenant aux ordres *Lactobacillales* et *Bifidobacterium*, qui synthétisent l'acide lactique comme un produit principal des fermentations des carbohydrates. Ils sont largement connus pour leurs applications industrielles principalement comme des ferments pour la fermentation alimentaire, comme des agents de biocontrôle et comme des probiotiques, possédant le statut « généralement reconnu comme étant sécurisé (GRAS) » par l'Agence Américaine pour l'Administration des Aliments et Drogues. En outre, les BL constituent un groupe de candidats importants pour les stratégies d'ingénierie métabolique (Gaspar et al., 2013).

Les BL peuvent s'adapter à de nombreuses conditions environnementales afin de survivre, puisqu'elles colonisent de nombreuses matrices alimentaires tels que le lait, la viande, les légumes et les céréales. Elles appartiennent aussi à la flore de l'appareil digestif et vaginal humain. Pour que cette colonisation se produise, les besoins nutritionnels complexes doivent être prévus, y compris les sucres fermentables et aussi plusieurs autres composants essentiels pour assurer et/ou améliorer leur métabolisme et ainsi produire un nombre important de métabolites avec de larges applications dans les aliments et l'industries pharmaceutiques (Mazzoli et al., 2014).

Les BL sont classées en deux groupes selon leurs voies métaboliques : (i) homofermentaires, où l'acide lactique est le principal produit final et hétérofermentaires, qui produit d'autres produits finis tels que l'acide acétique, dioxyde de carbone (CO₂) ou composés aromatiques, en plus de l'acide lactique. Parmi les bactéries appartenant au second groupe, les leuconostocs. Ce genre peuvent produire aussi des nombreux composés de grande valeur tels que l'éthanol, les agents antimicrobiens (Tropcheva et al., 2014) et les nutraceutiques tels que les vitamines et les polyols (Nuraida, 2015). Ces caractéristiques métaboliques constituent la principale contribution des leuconostocs et d'autres BL à la fabrication de produits alimentaires fermentés. La production d'acide lactique, qui provoque une diminution du pH, conserve plusieurs aliments en inhibant la prolifération de microorganismes indésirables. Cette acidité participe également à la formation de saveur et à la coagulation des caséines (principales protéines du lait), qui modifient la texture des produits tels que le fromage et d'autres laits fermentés (Papagianni, 2012). La production de dioxyde de carbone joue un rôle important pour la texture de certains de fromages, y compris la formation des cavités dans le coagulum des fromages comme le cas du fromage bleu en favorisant la colonisation de *Penicillium roqueforti* qui contribue à la texture et à la saveur finales. En outre, le dioxyde de carbone peut jouer lui-même un rôle d'agent antimicrobien (Saranraj et al., 2013).

Certaines BL synthétisent des exopolysaccharides (EPS) qui participent à l'amélioration des propriétés rhéologiques, structurelles, sensorielles des aliments fermentés avec un intérêt industriel élevé comme que le yaourt, le kéfir, le fromage et les produits à base de céréales (Monedero et al., 2010). En outre, certains d'entre eux se sont révélés avoir des propriétés bénéfiques pour la santé (antitumorales, immunomodulateurs et/ou prébiotique) et donc sont de bons candidats pour le développement d'aliments fonctionnels. Parmi ces EPS, les dextrans qui sont synthétisés en premier lieu par le genre *Leuconostoc*, et par d'autres genres *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Streptococcus* et *Weisella* de manière constitutive ou inductible (Pérez-Ramos et al., 2015). Ces produits biologiques synthétisés restent associés à la surface cellulaire constituant une capsule ou des polymères libres libérés dans l'environnement (Nwodo et al., 2012).

Le dextrane est composé de liaisons glycosidiques α -(1,6) dans les chaînes principales et les liaisons glycosidiques α -(1,2), α -(1,3) ou α -(1,4) ramifiées (Ciszek-Lenda, 2011). Son rendement est affecté par les conditions environnementales, les voies de biosynthèse et le taux de croissance microbienne (Sarwat et al., 2013). Le dextrane possède plusieurs applications dans l'industries alimentaire, pharmaceutique (Aman et al., 2012). Ce large éventail d'applications est dû à des différences des poids moléculaires des dextrans qui influence sur la viscosité et les propriétés rhéologiques de la solution de polymère. Un poids moléculaire élevé est utilisé dans la récupération du pétrole, des poids moléculaires moyens sont utilisés dans l'industrie chimique. Alors que le dextrane de bas poids moléculaire est appliqué dans l'industrie pharmaceutique et photographique (Vettori et al., 2012).

L'objectif principal de cette thèse de doctorat était la caractérisation moléculaire, physiologique, métabolique, rhéologique et physico-chimique des exopolysaccharides produits par les souches de *Leuconostoc*, isolées à partir des produits laitiers, ensilage, miel et produits carnés, ainsi que l'étude de l'activité biologique de ces polymères, en tant qu'agents immunostimulants.

À cette fin, les objectifs spécifiques suivants ont été abordés :

1. Étudier les caractères technologiques qui qualifient les souches de *Leuconostoc* à être utilisés en industrie laitière (activité protéolytique et lipolytique, acidification, utilisation de citrate, profil protéique, etc).
2. Établir des procédures pour détecter et démontrer la production de dextrane, par sa localisation physique au niveau cellulaire ainsi que leur caractérisation moléculaire et physico-chimique, en utilisant comme prototypes des souches de *L. mesenteroides* et

Lb. sakei isolées à partir des produits laitiers (lait de chamelle, lait de chèvre et lait de brebis, fromage bleu), d'ensilage, de miel et des produits carnés.

3. Étudier les propriétés rhéologiques des solutions aqueuses des dextranses à différentes concentrations en étudiant leur comportement d'écoulement résultant de l'analyse des données de viscosité apparente en fonction des taux de cisaillement, ainsi que leur concentrations critiques pour détecter la nature des chaînes des polymères.
4. Étudier la croissance, l'acidification du milieu de culture et la production de dextrane durant la consommation du saccharose et la production des métabolites intermédiaires (glucose et fructose) et finaux (acide lactique, mannitol) et établir des procédures de la purification de ces polymères pour l'étude de leur activité biologique.
5. Évaluer l'activité biologique des dextranses, en particulier leur capacité potentielle à immunomoduler les macrophages humains, en étudiant leur relation avec leur poids moléculaire.
6. Étudier les bases génétiques de la production de dextrane, à travers la détection du gène responsable codant pour la dextrane-saccharase.
7. Étudier le profil probiotique des souches de *Leuconostoc* y compris leur capacité à produire des substances antimicrobiennes et déterminer, *in vitro*, l'influence des dextranses sur la capacité bactéries productrices à adhérer sur les entérocytes humains et, *in vivo*, leur capacité de colonisation, en utilisant le poisson zèbre comme modèle.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Bactéries lactiques

1- Généralités et habitat des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) sont des microorganismes à Gram positif, qui produisent de l'acide lactique et qui partagent les caractéristiques suivantes : elles sont généralement immobiles, asporulées, catalase négative, anaérobies mais aérotolérantes. Pour se croître, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles) et de nombreuses BL ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras (Salminen et von Wright, 2004 ; Russell et Gould, 2012).

Les BL représentent un groupe hétérogène qui se trouvent dans des habitats riches en nutriments, elles peuvent coloniser de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, (y compris le lait maternel (Martín et al., 2003)), la viande, les poissons, les végétaux, les légumes, les céréales, les boissons, les eaux et le miel. Leur présence a été aussi marquée au processus d'ensilage. Les BL font partie de la flore buccale, intestinale, et vaginale humaine ou animale (Lasztity, 2009 ; König et Fröhlich, 2009 ; Rokop et al., 2015).

Les BL sont utilisées depuis plusieurs siècles comme des agents de protection et de stabilisation des produits alimentaires. Elles sont utilisées pour ces divers propriétés surtout celle de pouvoir fermenter le lactose et par conséquent leurs capacités d'acidification. Cette propriété permet d'améliorer les qualités organoleptiques des aliments qui dépendent aussi des autres propriétés microbiennes telles que le métabolisme du citrate, le catabolisme des acides aminés, la protéolyse, la lipolyse et la production des exopolysaccharides (EPS) (Zhang et Cai, 2014).

2- Classification et taxonomie

La base générale de la classification des BL est liée au travail d'Orla-Jensen (Orla-Jensen, 1921). Ce système de classification a établi la première classification des BL en se basant sur des critères morphologiques et physiologiques (la forme, type de fermentation, température optimale de croissance, activité catalase, etc). De ce fait, les BL peuvent être classifiées en trois groupes (i) homofermentaire, (ii) hétérofermentaire facultatif et (iii) hétérofermentaire strict (Vetamme et al., 1996 ; Mozzi et al., 2015). La taxonomie des BL a été révolutionnée en introduisant la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques qui a conduit à une reclassification importante de certaines espèces et sous-espèces. Plusieurs méthodes génotypiques, basées sur les acides nucléiques, sont aussi utilisées en classification

tel que le pourcentage en GC qui est retenu comme un élément principal dans la répartition des BL (König et Fröhlich, 2009). Selon Felis et al. (2015), les BL à faible teneur en G+C, appartiennent au Règne : *Bacteria*, Phylum : *Firmicutes*, Classe : *Bacilli*, Ordre : *Lactobacillales* renfermant 6 familles avec 38 genres, y compris les genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. La famille *Bifidobacteriaceae*, partage le même caractère principal des BL et qui est la production de l'acide lactique.

2-1- Genre *Leuconostoc*

Le terme *Leuconostoc* vient du mot *Nostoc* qui est une algue bleue mucilagineuse (cyanobactérie) et *Leuco* qui veut dire blanc. Le genre *Leuconostoc* a été défini en 1878 par Van Tieghem. Les premières souches ont été isolées à partir des accidents apparus dans les sucreries (Devoyod et poullain, 1988a). Les analyses génétiques ont montré que le groupe des leuconostocs comprend trois lignées : « *Leuconostoc sensu stricto* », « *Leuconostoc paramesenteroides* », « *Leuconostoc oenos* ». La découverte de ces lignées était la principale raison de deux propositions de reclassements : le genre « *Weissella* » a été associé à « *L. paramesenteroides* » et le genre « *Oenococcus* » a été associé à « *L. oenos* ». Les anciennes espèces aussi *L. cremoris* et *L. dextranicum* ont été classées comme des sous-espèces appartiennent à l'espèce *L. mesenteroides* avec l'ajout d'une troisième sous-espèce *mesenteroides* (Björkroth et Holzappel, 2006).

Le genre *Leuconostoc* a été classé dans la famille « *Streptococaceae* » jusqu'à l'année 2005 ou une nouvelle famille « *Leuconostocaceae* » a été proposé dans Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Cette nomenclature ne pouvait pas être validement publiée car aucune description de la famille n'était proposée, jusqu'à 2009, dans la deuxième édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Schleifer, 2015). Le genre *Fructobacillus* a été validement publié en septembre 2008. Leurs espèces, qui étaient classés dans le genre *Leuconostoc*, fermentent le glucose sans produire d'éthanol, contrairement aux autres genres de la famille (Endo et Okada, 2008).

Depuis la première classification du genre *Leuconostoc*, la taxonomie n'a pas cessé d'évoluer. Au fur et à mesure que les connaissances progressent, leur classification change pour s'adapter aux nouvelles connaissances scientifiques. Selon Hui et Evranuz (2016), Le genre *Leuconostoc* renferme 14 species (*mesenteroides*, *lactis*, *pseudomesenteroides*, *carosum*, *gelidum*, *fallax*, *citreum*, *gasicomitatum*, *kimchi*, *garlicum*, *inaha*, *holzappelii*, *palmae* et *miyukkimchii*). L'espèce *L. mesenteroides* est la plus employée en industrie agro-alimentaire, cet espece

renferme quatre sous-espèces (subsp. *mesenteroides*, subsp. *dextranicum*, subsp. *cremoris* et subsp. *suonicum* qui a été ajouté par Gu et al. (2012).

2-2- Genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* appartient à la famille *Lactobacillaceae*, la plus nombreuse et la plus hétérogène des BL, car environ 180 espèces sont reconnues, bien que de nouvelles espèces soient décrites presque mensuellement. En 1896, le genre *Lactobacillus* a été décrit pour la première fois par Beijerinck avec *Lactobacillus delbrueckii* comme espèce type. Le genre *Lactobacillus* est le groupe le plus important et le plus divers parmi les BL et comprend actuellement 158 espèces, dont sept sont composées de 18 sous-espèces (Donelli, 2016).

Les espèces sont disposées en fonction de leurs relations phylogénétiques en se divisant en 15 groupes phylogénétiques, sept paires (petits groupes phylogénétiques ne contenant que deux espèces) et sept singletons chacun représenté par une seule espèce. Parmi ces groupes, le groupe *Lactobacillus* comprend cinq espèces et sous-espèces: *curvatus*, *fuchuensis*, *graminis*, *sakei* subsp. *carneus* et *sakei* subsp. *sakei*. leur teneur en GC est comprise entre 41 et 44%. Ce groupe est hétérogène en termes de production d'ammoniac à partir d'arginine et acétoïne. *Lb. sakei* subsp. *carneus* et *Lb. sakei* subsp. *sakei* ont été isolées en 1996 des produits carnés et du vin, respectivement (Zhang et Cai, 2014).

3- Physiologie et voies métaboliques centrales

La technologie laitière a connu des améliorations importantes grâce aux connaissances accumulées depuis plusieurs dizaines d'années dans le domaine de la nutrition et du comportement des BL afin d'assurer une véritable maîtrise industrielle des ferments lactiques.

Les bactéries présentent des exigences nutritionnelles importantes qui varient beaucoup d'un groupe bactérien à un autre. Les BL y compris le genre *Leuconostoc* et *Lactobacillus*, sont hétérotrophes et nécessitent donc pour leur croissance l'apport de certaines substances organiques exogènes. Elles se caractérisent par des besoins nutritionnels particulièrement complexes car en plus d'un sucre fermentescible, elles nécessitent la présence de plusieurs acides aminés essentiels pour assurer leur métabolisme. Ces acides aminés se trouvent soit sous forme libres ou complexe sous forme de peptide ou de protéines comme la caséine, cette dernière nécessite un système protéolytique actif pour obtenir les acides aminés désirés (Mayo et al., 2010).

Les BL peuvent avoir un métabolisme :

- homofermentaire : plus de 90% des produits de fermentation est de l'acide lactique (par exemple, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus* sp, *Lactococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Aerococcus* sp. et certaines espèces de *Lactobacillus*).
- hétérofermentaire facultatif : ce qui leurs permet de métaboliser les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire et les pentoses par voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate (certaines espèces de *Lactobacillus*, y compris *Lb. sakei*) (Martín et al., 2006).
- hétérofermentaire strict : où elles produisent, en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂ (certaines espèces de *Lactobacillus*, *Oenococcus* sp., *Weissella* sp., *Leuconostoc* sp., y compris l'espèce *Leuconostoc mesenteroides*. (Vetamme et al., 1996 ; Zhang et Cai, 2014).

Les BL homofermentaires utilisent principalement la voie du métabolisme des sucres Embden-Meyerhoff-Parnas, elles sont des bactéries dépourvues de la phosphocétolase, capable de synthétiser la fructose-1,6-bisphosphate et incapables de métaboliser les pentoses. Cependant, les BL hétérofermentaires suivent dans leur fermentation la voie des pentoses-phosphate possédant l'enzyme clé phosphocétolase. Dans le cas des bactéries hétérofermentaires facultatives, les hexoses sont fermentés par voie homolactique et les pentoses par voie hétérolactique (Salminen et von Wright, 2004).

3-1- Transport et métabolisme des sucres

L'imperméabilité de la membrane cytoplasmique des bactéries à de nombreux composés peut empêcher la pénétration de plusieurs substrats importants pour leur développement. Cela est dû à la structure hydrophobe de la membrane qui laisse pénétrer dans le cytoplasme les composés apolaires par diffusion mais se révèle imperméable aux composés polaires hydratés tels que les sucres. Le passage de ces derniers solutés au cytoplasme nécessite la présence de systèmes de transport localisés au niveau de la membrane. Il y a deux systèmes sont particulièrement importants chez la plupart des BL : (i) le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS), qui couple le transport et la phosphorylation du glucide, et (ii) le système perméase énergie-dépendant, qui fait pénétrer les sucres sous forme libre (Salminen et von Wright, 2004).

a- Genre *Leuconostoc*

Les leuconostocs prennent les glucides par l'intermédiaire des perméases qui permet l'entrée des sucres dans la cellule sans modification. Ces bactéries sont dépourvues des cytochromes et de certaines enzymes comme la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA), qui clive le fructose-1,6-diphosphate en deux molécules à trois carbones, dépourvus aussi d'une triose-phosphate isomérase (TPI), elles obtiennent leur énergie que par la fermentation en produisant en plus de l'acide lactique, du CO₂, d'éthanol ou d'acétate. Une grande variété de mono- et di-saccharides alimentent la croissance des leuconostocs. La fermentation des sucres tel que l'arabinose, le xylose, le ribose et le fructose, ne constitue pas qu'un critère phénotypique pour différencier les espèces et les sous-espèces du même genre, mais aussi un point essentiel d'un grand intérêt qui participe dans la sélection des souches avec une application potentielle (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

▪ Métabolisme du lactose

Chez les leuconostocs, le lactose est clivé en galactose et glucose par l'enzyme β -galactosidase, les deux monosaccharides sont ensuite utilisés par la voie de Leloir et la voie des pentoses-phosphates, respectivement (Fig. 1). Le galactose est phosphorylé par enzyme galactokinase en galactose-1-P, ce dernier est transformé en glucose-1-P puis, par enzyme phosphoglucomutase, en glucose-6-P, qui suit finalement la voie des pentoses-phosphates jusqu'à la formation de phosphoénolpyruvate, Ce dernier est transformé par la suite en pyruvate par le biais du pyruvate kinase (Bourel et al., 2001b).

La fermentation d'une mole de lactose conduit à la formation de quantités équimolaires de lactate, d'éthanol et de CO₂, et des traces de formiate et d'acétate peuvent aussi être produits. Le D-lactate produit peut ensuite être utilisé lors de la synthèse du précurseur du peptidoglycane ce qui permet à ces bactéries la résistance à la vancomycine (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004, Kihal et al., 2007).

Deux voies de dégradation de l'acétyl-P sont utilisées par les leuconostocs. Dans la première, l'acétyl-P est transformé en acétyl-CoA par une phosphotranscétyle, en présence de CoA, puis en acétaldéhyde qui est transformé en éthanol par l'enzyme alcool déshydrogénase (deux réductions successives), dans la deuxième voie, l'acétyl-P est directement transformé en acétate par l'acétate kinase, avec gain d'une molécule d'ATP. L'acétyl-CoA joue un double rôle chez *Leuconostoc* vu la compétition par l'acétate kinase et la phosphotransacétyle pour l'acétyl-P qui détermine le flux de carbone, l'acétate kinase dirige le flux de carbone vers la production d'acétate, ce qui permet la formation d'ATP nécessaire à la croissance.

La phosphotransacétylase oriente le flux vers la production d'acétyl-CoA utilisé pour la synthèse de biomasse (acides aminés, acides gras, etc.) ou la réoxydation du NADH via l'alcool déshydrogénase. Les études ont montré que l'absence d'oxygène augmente l'activité de l'enzyme phosphotransacétylase et diminue celle de l'acétate kinase (Laëtitia et al., 2014).

La voie principale qui correspond à la phase finale de la glycolyse est, comme chez les lactocoques, la transformation de pyruvate en acide lactique par lactate déshydrogénase. La voie du pyruvate formiate lyase existe aussi chez les leuconostocs, elle permet la synthèse de l'acétyl-CoA, avec libération du formiate. La voie commune aussi avec les lactocoques, est celle du diacétyle et de l' α -acétolactate dont la décarboxylation (Acétolactate décarboxylase) produit l'acétoïne. Le diacétyle peut subir deux réductions la première aboutit à la formation d'acétoïne et la réduction de ce dernier par acétoïne réductase conduit à la formation de 2,3-butane-diol (Mayo et al., 2010).

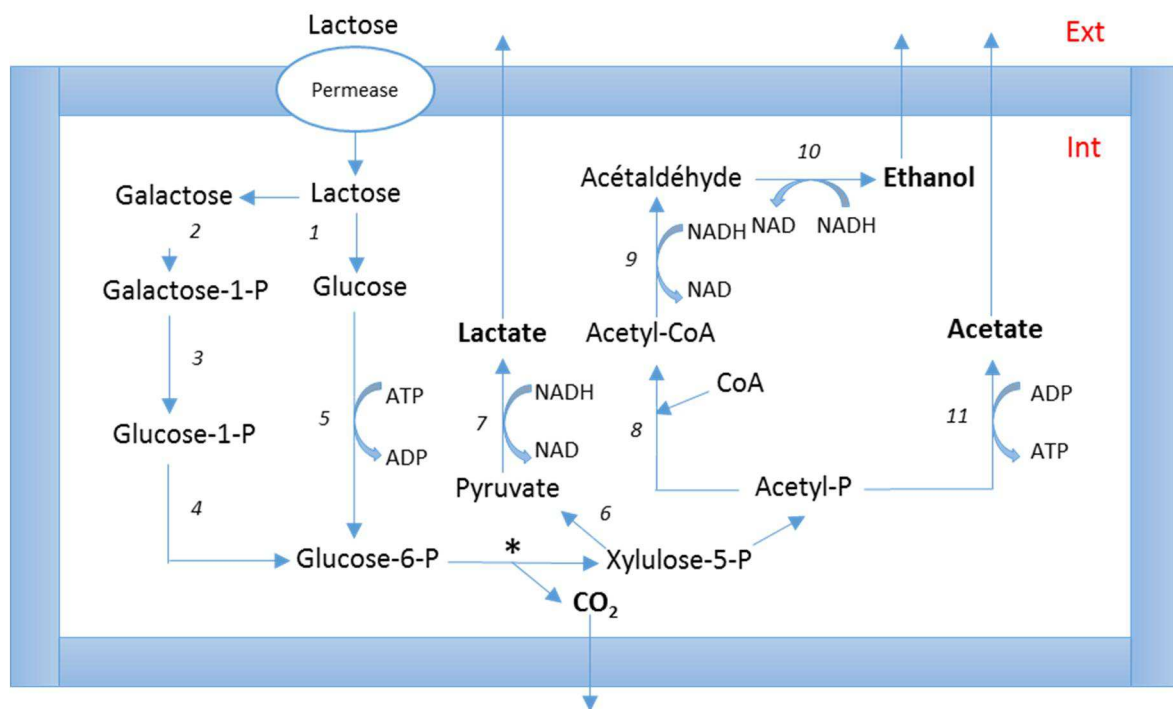


Figure 1. Métabolisme du lactose chez *L. mesenteroides* 1, β -galactosidase ; 2, galactokinase ; 3, Galactose-1-phosphate uridylyltransférase ; 4, phosphoglucomutase ; 5, glucokinase ; 6, Phosphoketolase ; 7, lactate dehydrogenase ; 8, phosphotransacétylase ; 9, CoA dépendante aldéhyde déhydrogénase ; 10, alcool déhydrogénase ; 11, acétate kinase ; CoA, coenzyme A ; *, plusieurs réactions enzymatiques (Harutoshi, 2013).

▪ Métabolisme du glucose

Le glucose libre est accumulé par l'intermédiaire d'un transport actif suivi par une phosphorylation intracellulaire par le biais d'une glucokinase. Le glucose-6-phosphate emprunte ensuite la partie oxydative de la voie des pentoses-phosphate qui conduit à la formation de xylulose-5-phosphate (Fig. 2). Ce dernier est scindé en acétyl-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate par la D-xylulose-5-phosphate phosphocétolase, enzyme spécifique à la voie hétérofermentaire. Enfin, l'acétyl-phosphate est converti en éthanol ou en acétate, et le glycéraldéhyde-3-P qui rejoint la glycolyse pour produire l'acide lactique (König et Fröhlich, 2009).

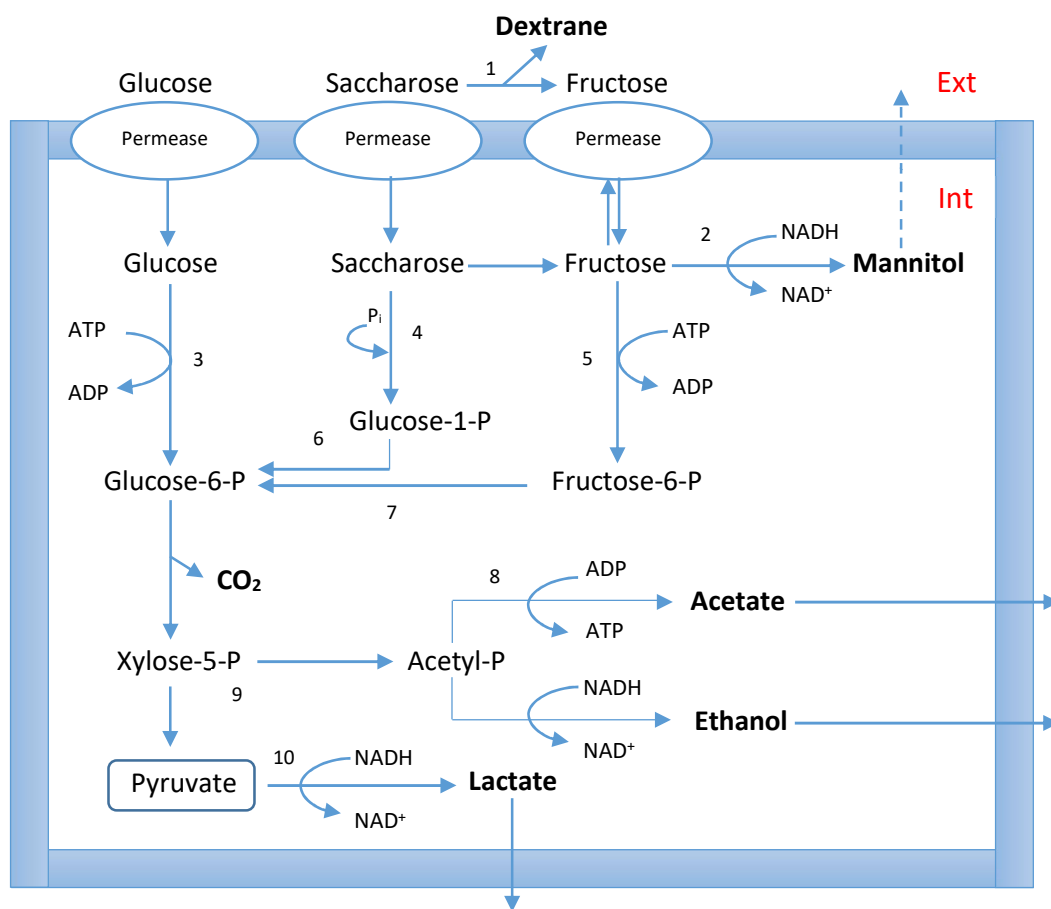


Figure 2. Voies métaboliques centrales de divers sucres chez *L. mesenteroides*. 1, dextrane-saccharase; 2, mannitol déshydrogénase; 3, glucose kinase; 4, saccharose phosphorylase; 5, fructokinase; 6, phosphoglucomutase; 7, glucose phosphate isomérase; 8, acétate kinase; 9, phosphocétolase; 10, lactate déshydrogénase (Hemme et al., 2004).

▪ **Métabolisme du fructose**

Les leuconostocs peuvent aussi fermenter le fructose peut (i) être converti en fructose-6-phosphate, qui entre par la suite dans la voie des pentoses-phosphates et (ii) être converti en mannitol (Fig. 2).

✓ **La production du mannitol**

Le mannitol peut être produit par l'utilisation de diverses stratégies: (i) synthèse chimique, qui implique des réactions d'hydrogénation et de réduction, (ii) synthèse microbienne ou bioconversion utilisant des cellules entières pour le biocatalyseur, une méthode simple qui s'est avérée la plus appropriée pour la production de mannitol en raison de sa simplicité (Papagianni, 2012b) et (iii) synthèse par biocatalyse, via laquelle le mannitol peut être produit enzymatiquement (Bhatt et al., 2013). Le mannitol produit peut être stocker sous forme d'une réserve commune ou sécréter à l'extérieur par divers micro-organismes tels que les champignons, les levures et certaines bactéries y compris les BL (Patra et al., 2009). Parmi les BL hétérofermentaires, seules certaines espèces appartenant aux genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Lactobacillus* sont capables de produire le mannitol sans l'utiliser, contrairement aux BL homofermentaires qui sont capables de suivre les deux voies de métaboliques (cataboliques et anaboliques) (Gaspar et al., 2013). Les leuconostocs productrices du mannitol utilisent le fructose libre comme un substrat principal responsable de la conversion (Hemme, 2012). Ils ne possèdent pas l'enzyme mannitol phosphate déshydrogénase, responsable de la conversion chez les BL homofermentaires, mais ils possèdent la mannitol déshydrogénase qui utilise un fructose intracellulaire pour assurer la biosynthèse (Fig. 2). La synthèse de la mannitol déshydrogénase chez *Leuconostoc pseudomesenteroides* semble être constitutive, alors que chez *Lactobacillus brevis* l'expression de l'enzyme est induite par la croissance en présence du fructose (Wisselink et al., 2002).

▪ **Métabolisme du saccharose**

Pendant la croissance en présence du saccharose, une grande partie de ce sucre est converti par les espèces des leuconostocs, en dehors de la cellule, en homopolysaccharides du type dextrane, alternane ou levane, respectivement, par l'enzyme dextransucrase, alternansucrase ou levanesucrase, respectivement (Sanlibaba et Çakmak, 2016). Le saccharose non converti va pénétrer dans la cellule ou il va être phosphorylé par l'enzyme sucrose phosphorylase inductible et converti en glucose-6-P par le biais de l'enzyme constitutive phosphoglucomutase pour rejoindre la voie des pentoses phosphates (Hemme et al., 2004).

▪ **Métabolisme des autres carbohydrates**

Le catabolisme des pentoses se produit via le pentose-P, clivé par la phosphocétolase au glycéraldéhyde-3-P et l'acétyl-phosphate (acétyl-P), en produisant, en plus du D-lactate, l'acétate et un seul ATP sans production d'acétaldéhyde ou d'éthanol. Il existe plusieurs sucres chez les leuconostocs qui sont classés comme des sources de carbone essentiels dans l'identification phénotypique, comme arabinose qui est utilisé comme sucre clé pour différencier entre *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, cette dernière est incapable de le métaboliser (Björkroth et Holzapfel, 2006) L'utilisation du raffinose par les leuconostocs est un caractère variable (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

L'utilisation des sucres aboutit non pas à un, mais à deux produits intermédiaires importants : l'acétyl-P et le pyruvate, qui est issu aussi du métabolisme du citrate.

▪ **Métabolisme du citrate**

Le métabolisme du citrate permet au BL (i) d'utiliser une autre source de carbone pour sa croissance, (ii) de résister à des conditions acides, (iii) de générer une "force motrice du proton" (PMF) et (iiii) de libérer des composés organiques connus par leur participation dans la qualité organoleptique des produits laitiers tels que le beurre et le fromage en fournissant des saveurs typiques de noisette et de beurre et par leurs effets bactériostatiques (Gemelas et al., 2014).

Les études physiologiques ont mis en évidence l'importance des facteurs environnementaux tels que le pH, la concentration de citrate et d'oxygène comme étant des paramètres influents sur la synthèse des composés impliqués dans la formation de la qualité sensorielle finale des produits fermentés par ces BL (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

Cette transformation a pu être observée chez plusieurs espèces de BL principalement : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (Garcia-Quintans et al., 2008), *Lactobacillus plantarum*, *Oenococcus oeni*, *Weissella paramesenteroides* et certaines espèces des genres *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* (Bartowsky et Henschke, 2004, Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004, Wood et Holzapfel, 1995). La majorité des BL citrate positive sont incapables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone mais elles l'utilisent qu'en présence d'un sucre fermentescible, sous des conditions d'anaérobiose strictes. Les leuconostocs peuvent l'utiliser comme seule source de carbone seulement à un pH acide (Hemme, 2012). Le co-métabolisme sucre/citrate augmente leur taux de croissance et leur rendement dans des conditions acides. Cette fermentation est régulée par différents facteurs

environnementaux quel que soit le type de voie métabolique impliqué, homo- ou hétérolactique (de Vos et Hugenholtz, 2004).

✓ Conversion du citrate en pyruvate

Cette première étape du métabolisme est commune entre les deux groupes des BL, c'est lorsque l'acide citrique se convertit en pyruvate (Fig. 3).

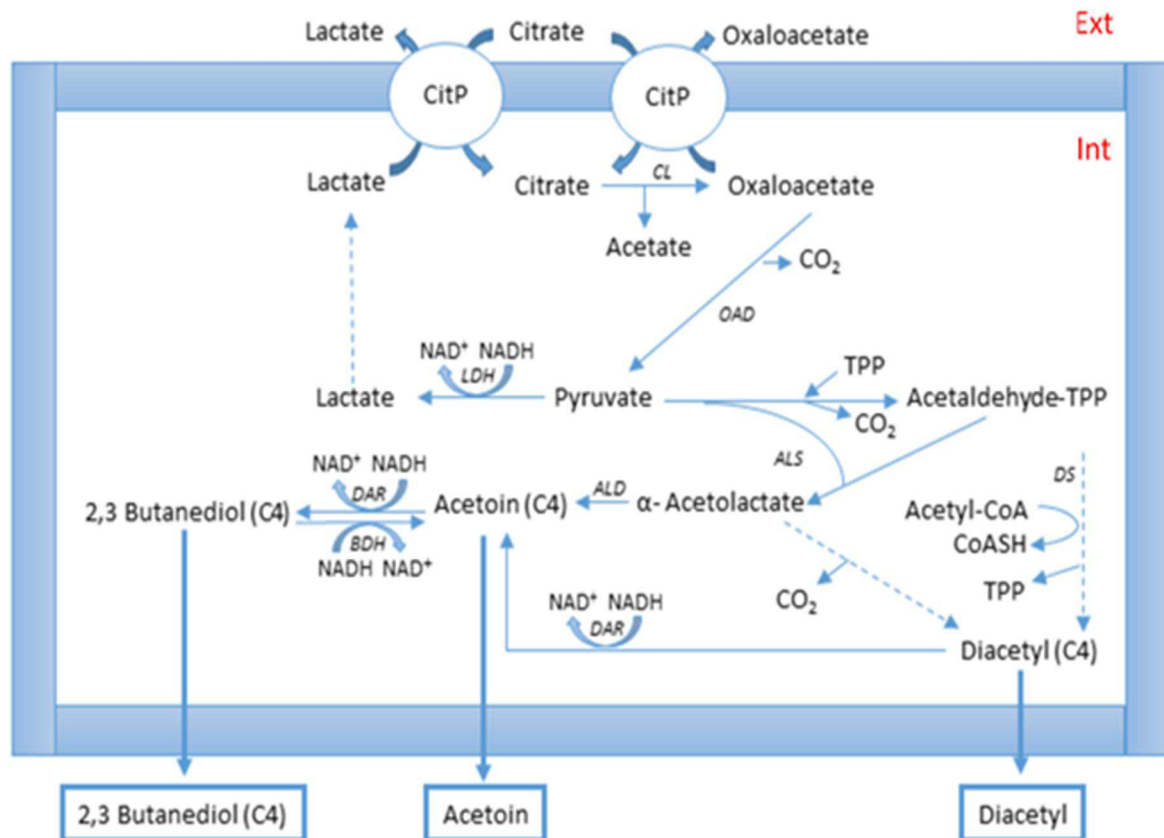


Figure 3. Principales étapes du métabolisme du citrate et production des substances responsables d'arôme chez *Leuconostoc*. CitP, citrate perméase P ; CL, citrate lyase ; OAD, oxaloacétate décarboxylase ; LDH, lactate déshydrogénase ; ALS, α-acétolactate synthase ; ALD, α-acétolactate decarbolyase ; DAR, diacétyl/acétoine réductase ; BDH, 2,3-Butanediol déshydrogénase ; TPP, pyrophosphate de thiamine ; CoA: coenzyme A (Bourel et al., 2001).

Ce catabolisme est instable chez les leuconostocs parce que la plupart de gènes impliqués dans l'internalisation et le catabolisme sont codés par des plasmides. Trois étapes conduisent à la synthèse du pyruvate. Tout d'abord, le transport du citrate à l'intérieur de la cellule est assuré par la citrate perméase P (CitP), un membre des transporteurs de la famille 2-

hydroxycarboxylate, par échange d'anions lactate produits lors du co-métabolisme glucose/citrate contre la forme dianionique du citrate (Hcit^{2-}) (Bourel et al., 2001a). L'expression de du gène *citP* est inductible par la présence du citrate chez *Leuconostoc* (Hemme, 2012) et par stress acide chez *Lactococcus* (García-Quintans et al., 2008).

Ensuite, l'hydrolyse du citrate à l'intérieur de la cellule conduit à la formation d'acétate et d'oxaloacétate (OXA) par l'action de la citrate lyase. Finalement, OXA est décarboxylé par l'oxaloacétate décarboxylase en pyruvate et CO_2 , les deux produits communs entre la voie des pentoses phosphates et le métabolisme du citrate chez les leuconostocs. Le taux de pyruvate disponible dépend de l'activité des enzymes impliquées dans la bioconversion du citrate (Gemelas et al., 2014).

Pour éviter le stress provoqué par les niveaux toxiques de OXA, les cellules utilisent la voie de transamination comme deuxième voie d'échappement pour éliminer l'excès de ce produit toxique en échange avec le citrate *via* CitP (Fig. 3). OXA peut être utilisé également pour produire les composés responsables d'arôme à partir des acides aminés par des amino-transférases (Pudlik et Lolkema, 2013).

✓ Devenir du pyruvate

Le pyruvate issu du citrate conduit à la formation (i) de lactate par la lactate déshydrogénase, avec l'utilisation de NADH et (ii) des composés C4 qui sont produits dans les conditions d'aérobiose acides (Fig. 3). Le co-métabolisme sucre/citrate conduit à la production de pyruvate (C3) en excès, cette augmentation de la concentration conduit à une augmentation du flux vers la voie C4 (Hervé et al., 2008). En présence de pyrophosphate de thiamine, le pyruvate est décarboxylé pour former le CO_2 et de l'acétaldéhyde thiamine pyrophosphate (un composé C2). L' α -acétolactate synthase condense cette dernière avec une seconde molécule de pyruvate, produisant à la synthèse d'une mole d' α -acétolactate (un composé C5). Cette étape métabolique favorise l'élimination de ce composant toxique. L' α -acétolactate est ensuite décarboxylé en acétoïne (un composé C4) dans une réaction catalysée par l' α -acétolactate décarboxylase. En présence d'oxygène, l' α -acétolactate est également spontanément décarboxylé en diacétyl (un composé C4). Cependant, autres voies enzymatiques impliquant cofacteurs ou l' α -acétolactate décarboxylase pourrait conduire au même produit fini. Le diacétyl acétoïne réductase catalyse (i) la réduction d'acétoïne en 2,3-butanediol (un composé C4) et (ii) la réduction de diacétyl en acétoïne. Cette dernière réaction est réversible car le 2,3-butanediol peut être réoxydé en acétoïne par la butanediol déshydrogénase. l'activité réductrice est optimale dans des conditions légèrement acides, tandis que, l'activité oxydante est optimale dans un milieu alcalinisé. Dans

des conditions acides, l'acétoïne et le diacétyl rentrent en compétition pour l'enzyme diacétyl acétoïne réductase, bien que cette dernière ait un K_m inférieur pour l'acétoïne que pour le diacétyl (Smid et Kleerebezem, 2014).

b- Genre *Lactobacillus*

Les sucres libres chez les lactobacilles peuvent être transportés par les deux systèmes (i) système perméase et (ii) système PTS. Le transport du glucose, fructose, mannose, mannitol, galactose et le lactose peut se produire à travers le système PTS. Dans une souche de *Lactobacillus casei*, le PTS semble être le principal mécanisme de transport de fructose, mannose, mannitol, sorbose, sorbitol, cellobiose et lactose (Barrangou et al., 2011). Comme toutes les LAB, les espèces appartenant au genre *Lactobacillus* sont chimiohétérotrophes, ce qui signifie qu'elles obtiennent leur énergie pour le maintien et la synthèse des macromolécules uniquement à partir de la phosphorylation des substrats (la fermentation). La glycolyse est la voie la plus courante, mais la voie du pentose phosphate est également utilisée dans de nombreuses espèces. La première étape des voies de fermentation est la phosphorylation des sucres libres. La phosphorylation du glucose dans la plupart des espèces se produit par l'intermédiaire de la réaction de la glucokinase ATP-dépendante, alors que dans certaines espèces elle se produit *via* le PTS. Les lactobacilles se retrouvent dans les trois groupes de LAB lorsqu'ils sont classés en fonction du mode de fermentation des glucides (Barrangou et al., 2011, Zhang et Cai, 2014).

Certaines espèces du genre *Lactobacillus* partagent un caractère technologique très important avec les leuconostocs et qui la production du dextrane en utilisant le saccharose comme *Lb. sakei* et *Lb. curvatus* (Harutoshi, 2013).

Le métabolisme du citrate constitue une propriété technologique importante chez plusieurs espèces *Lactobacillus* homofermentaires et hétérofermentaires comme *Lb. plantarum*, *Lb. casei* et *Lb. brevis* (Palles et al., 1998). Selon Medina de Figueroa et al., 2000, *Lb. rhamnosus*, *Lb. zae* et *Lb. plantarum* utilisent le citrate comme seule source d'énergie, sans le co-métaboliser avec le glucose. Par contre, *Lactobacillus sanfranciscensis* utilise le citrate en présence du maltose, où l'acide lactique et l'acide acétique sont initialement produits, mais que le citrate sera épuisé, l'acide lactique et l'éthanol seront les principaux produits (Ljungh et Wadström, 2009).

4- Rôle des leuconostocs

Les BL présentent un grand intérêt biotechnologique. Elles sont largement utilisées dans des procédés d'élaboration de produits alimentaires. Les leuconostocs généralement ne sont pas utilisés pour la production d'acide dans la fermentation laitière, mais ils sont principalement utilisés pour leurs diverses propriétés métaboliques importantes en combinaison avec des souches pures ou mixtes de *Lc. lactis* subsp. *lactis* (ferments acidifiants mésophiles) dans la fabrication d'un certain nombre de produits laitiers fermentés, principalement les fromages (fromage bleu, fromages cottage, Feta, Gouda et Edam), les beurres et les crèmes (Hollet et Liu, 2011).

4-1- Amélioration de la structure du fromage par la production du CO₂

La production de CO₂ par les espèces du *Leuconostoc* provient de l'hétérofermentation du lactose et de l'utilisation du citrate, dans la technologie des fromages à pâtes persillées, notamment le Roquefort, le CO₂ produit est à l'origine de la formation des cavités dans le caillé, qui seront ensuite peuplées par le *Penicillium roqueforti*. Le CO₂ produit donne aussi l'aspect légèrement effervescent et onctueux au beurre. Les formes des ouvertures ne dépendent pas que du processus de production gazeuse, mais aussi de la texture du caillé, les fentes rugueuses étant plus présentes dans les fromages, les trous brillants ronds réguliers ou irréguliers sont plus présents dans le pâte flexible (Hemme, 2012).

Une densité de 6×10^6 unité formant colonie (ufc) par mL de leuconostocs est suffisante pour obtenir des ouvertures dans la pâte de fromage du Roquefort dont la concentration maximale de CO₂ produite dans ce fromage est de 16 mM par kg. Les résultats des travaux effectués ont prouvé que le citrate stimule la croissance des leuconostocs et augmente l'émission de CO₂ qui semble être faiblement produit chez *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*. En outre, il est bien connu que la sous-espèce *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* confère une qualité supérieure aux fromages bleus (Bellengier et al., 1994 ; Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

4-2- Utilisation des leuconostocs comme des levains d'arôme

Lorsqu'elles soient présents à une concentration suffisante, les leuconostocs jouent un rôle dans la production d'arômes qui pourrait être direct par la production de composés ou de précurseurs ou indirects en influençant le développement des autres microorganismes possédant cette propriété. La production de ces composants qui participent dans l'amélioration des propriétés organoleptiques des aliments en provoquant des changements de texture et d'arôme, résulte de

plusieurs voies : (i) l'utilisation du citrate, (ii) le catabolisme des acides aminés, (iii) la protéolyse, (iv) la lipolyse et (v) la lyse cellulaire (Hemme et al., 2004).

A partir de la fermentation du co-métabolisme sucre/citrate, les *Leuconostoc* peuvent produire le diacétyle, le principal composé aromatique recherché dans les produits laitiers, l'acétoïne, le 2,3-butanediol, l'éthanol et l'acétate (Smid et Kleerebezem, 2014), ces produits peuvent avoir un effet positif dans les produits laitiers tels que le beurre et le fromage cottage en fournissant un goût typique de noisette et de beurre, et en contribuant à la texture et à la flaveur (Martino et al., 2016). Les cultures pures de *Leuconostoc* et de *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* se comportent d'une façon différente vis-à-vis la production de diacétyle et d'acétoïne. Dans du lait ou dans du bouillon contenant du citrate, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* produit du diacétyle, de l'acétoïne et consomme le citrate dès que la croissance commence tandis que les cultures pures des *Leuconostoc* utilisent le citrate très rapidement, par contre elles ne produisent du diacétyle et de l'acétoïne que tardivement, lorsque le milieu est devenu suffisamment acide (Devoyod et Poullain, 1988b, Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

Le catabolisme des acides aminés est considéré comme le principal processus impliqué dans le développement de composés aromatiques pendant la maturation du fromage (Martínez-Cuesta et al., 2013). La conversion des acides aminés en divers alcools, aldéhydes, acides, esters et composés soufrés pour compléter le profil aromatique dépend de l'activité des enzymes cytoplasmiques (Smit et al., 2005). L'équipement enzymatique du *Leuconostoc* indique son potentiel à cataboliser les acides aminés. L'activité des aminotransférases, qui catalyse une autre étape de dégradation importante, est présente chez les espèces du genre *Leuconostoc*. Ces dernières présentent un potentiel plus faible vis-à-vis le catabolisme du méthionine en composés soufrés volatils, qui jouent un rôle important dans la formation d'arômes lors de la maturation du fromage (Hanniffy et al., 2009). L'OXA produit à partir du citrate peut être converti en aspartate par transamination. Cette réaction peut également être impliquée dans la biosynthèse des autres acides aminés à partir d' α -cétoacides (glutamate à partir du α -cétoglutarate et de la leucine à partir du α -cétoisocaproate). L'acétaldéhyde produit aussi est un composé aromatique majeur chez les fromages, les crèmes et les laits fermentés (Hollet et Liu, 2011).

La protéolyse est considérée comme l'un des procédés biochimiques les plus importants dans la fabrication des produits laitiers fermentés, contribuant ainsi au développement des caractéristiques sensorielles, les espèces du genre *Leuconostoc* utilise peu de protéines pour la croissance, ce qui entraîne une croissance limitée dans le milieu lait, de ce fait, elles se trouvent obligées d'utiliser les acides aminés et de les peptides présents à l'extérieur. Néanmoins,

l'incubation de certaines souches de *Leuconostoc* dans le lait indique une protéolyse de caséine, en changeant le goût et la texture finale. Il est probablement lié à une certaine lyse des cellules qui libèrent les enzymes protéolytiques internes (Hemme, 2012).

Les BL, y compris les leuconostocs, sont considérées comme des bactéries faiblement lipolytiques (Walstra et al., 2005). Les activités de l'estérase sont détectées chez *Leuconostoc* pour les composés C2 à C4, mais pas pour les longues chaînes de l'hydrolyse de la tributyrine, un triglycéride connu présent dans le beurre, a été décrite pour une souche de *L. mesenteroides*. *Lc. lactis* synthétise des esters butyliques et éthyliques à partir de tributyrine et d'éthanol par une réaction de transférase (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004 ; Hemme, 2012). L'éthanol, l'alcool le plus courant dans le fromage et le produit caractéristique de l'hétérofermentation des leuconostocs, est aussi un précurseur obligatoire d'un grand nombre d'esters éthylique. La biosynthèse de l'ester est probablement plus due à l'alcoololyse (hydrolyse par l'éthanol) qu'à l'estérification (l'estérase). Ces esters sont connus par leur goût fruité qui forme une partie de l'arôme de nombreux fromages mous et semi-durs. Néanmoins, ces esters pourraient être un défaut si sont présent avec une concentration trop élevée (Liu et al., 2004). Non seulement les cellules intactes, mais également les cellules lysées contribuent au processus de formation des arômes lors de la fermentation des aliments. La lyse cellulaire entraîne la libération d'enzymes cytoplasmiques dans les matrices des denrées alimentaires. Beaucoup de ces enzymes libérées conservent leur fonctionnalité à l'extérieur et continueront à convertir les substrats dans la matrice alimentaire. Il a été démontré que la lyse des ferments lactiques joue un rôle essentiel dans le processus de maturation du fromage (Lortal et Chapot-Chartier, 2005 ; Smid et Kleerebezem, 2014).

4-3- Utilisation des leuconostocs pour éliminer certains défauts de goût

Une petite quantité d'acétaldéhyde est reconnue comme participant à l'obtention d'un bon arôme, par contre un excès ou une surproduction de ce composé, qui peut être produit par les ferments dans le beurre et les laits fermentés, par rapport au diacétyl provoque un défaut dit de « vert » ou d'« acre ». Ce défaut peut être enrayé par l'emploi de souches qui métabolisent l'acétaldéhyde. Il est possible d'éliminer le défaut de « vert » d'une culture de BL en utilisant les leuconostocs ; mais pour cela il est nécessaire d'en ajouter une grande quantité dont l'activité est maximale pour *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004). Les leuconostocs peuvent utiliser l'acétaldéhyde comme accepteur d'électrons, en le réduisant en éthanol. Alternativement, leuconostocs peut oxyder l'acétaldéhyde en acide acétique. Elles peuvent utiliser aussi l'oxygène comme un accepteur d'électrons pendant la

fermentation du sucre, ce qui entraîne plus d'acide acétique et d'ATP mais moins d'éthanol formé (Hollet et Liu, 2011).

Les leuconostocs peuvent aussi participer dans l'élaboration des aliments fonctionnels, cela inclut leur ajout comme des probiotiques et/ ou l'addition de métabolites produits en exerçant un effet bénéfique pour la santé et en luttant contre les maladies.

4-4- Utilisation des leuconostocs comme probiotiques

Contrairement aux certains microorganismes qui sont actuellement proposé aux consommateurs, les souches de *Leuconostoc* ne colonisent pas le tractus intestinal mais peuvent survivre pendant le temps limité de transit. On s'attend donc à ce que leur effet sur l'hôte par des actions bactériennes soit faible, sauf lorsqu'elles seront ingérées à des concentrations cellulaires élevées. Des études de la lutte contre la diarrhée chez les enfants par l'ingestion des laits fermentés a révélé que le yoghourt indien contenant 10^8 de *Lc. lactis* et *L. mesenteroides* réduit la durée moyenne de la diarrhée de 0,3 jour (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004). L'addition de la tryptone (100 mg par L) aux laits fermentés par les espèces de *Leuconostoc* augmente leur valeur thérapeutique liée à une biodisponibilité plus élevée de fer, de zinc, de magnésium et d'acides gras en augmentant leur temps de transit (Shobharani et Agrawal, 2009). Plusieurs travaux ont confirmé l'appartenance de ce genre au groupe des genres proposés comme probiotiques (Diana et al., 2015 ; Giles-Gómez et al., 2016).

4-5- Production du mannitol

Le mannitol ou le sucre de la manne (Bhatt et al., 2013), il se retrouve dans les feuilles d'olivier, les algues marines, les fruits et les légumes (Oddo et al., 2002). Cet important polyol hexitol est utilisé principalement dans l'industries alimentaire, pharmaceutique et chimique (Saha et Racine, 2011). Il est largement distribué dans la nature. Le mannitol est utilisé dans les produits alimentaires destinés aux diabétiques comme un ingrédient alimentaire à faible teneur en calories (additif alimentaire E421) comme les autres « sucre alcools », qui ont été utilisés en toute sécurité dans les régimes alimentaires. Le mannitol a une faible solubilité dans l'eau (18% (p/v) à 25 °C), en particulier dans les solutions alcalines (Soetaert et al., 1999). Le mannitol, en tant qu'un métabolite commun entre plusieurs microorganismes, contribue aux interactions complexes entre les plantes et les agents pathogènes (Guo et al., 2012) en fournissant aux plantes la défense nécessaire (Patel et Williamson, 2016), ce qui participent dans l'amélioration de la qualité des produits alimentaires à base des plantes. Le mannitol est également couramment utilisé dans l'unité de soins intensifs, dans l'œdème cérébral et l'insuffisance rénale

aiguë et il est métabolisé indépendamment de l'insuline (Bhatt et al., 2013). Le mannitol est bien connu aussi pour sa capacité à augmenter le passage du potassium et du saccharose du sang vers le cerveau (Sil et al., 2016). L'étude de la toxicité montre que le mannitol n'a pas causé d'effets indésirables (Livesey, 2003 ; Kaialy et al., 2016). *L. pseudomesenteroides* et *L. mesenteroides* sont connus par leur capacité à produire ce polyol à partir de la fermentation de fructose comme cité précédemment.

4-6- Hydrolyse des α -galactosides

Les α -galactosides, comme le melibiose, le stachyose et le raffinose, sont couramment présents dans les plantes, ne sont pas métabolisés par le mammifère à cause de l'absence de l'enzyme responsable « α -galactosidases » dans la muqueuse intestinale, entraînant par conséquent une flatulence. Afin d'éviter ces inconvénients et stimuler la consommation des produits alimentaires hautement nutritifs, plusieurs tentatives sont faites pour éliminer les α -galactosides en utilisant quelques méthodes comme l'addition de l'enzyme α -galactosidase. Il a été proposé d'utiliser les leuconostocs qui possèdent l'enzyme α -galactosidase comme un approche biotechnologique pour éliminer α -galactosides (Spencer et de Spencer, 2004).

4-7- Production des vitamines

Les souches de *L. mesenteroides* productrices des quantités importantes de ménaquinones (vitamine K2) et la riboflavine qui ont été utilisées comme des starters dans les produits alimentaires notamment, les produits laitiers ou comme des suppléments diététiques afin de prévenir et lutter contre les maladies de carence en vitamine K. la production de folate (vitamine B9) a été aussi rapporté dans *L. lactis* et *W. paramesenteroides* (Hemme, 2012).

4-8- Production des substances antimicrobiennes

La bioconservation est l'extension de la durée de conservation et de la sécurité des aliments en utilisant une microflore naturelle contrôlée et/ou leurs produits antimicrobiens. Parmi les substances microbiennes produites par les BL, on peut citer: l'acides lactique, l'acide acétique, l'acide formique, l'acide propionique, les bactériocines, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, la réutérine et dioxyde de carbone et diverses substances inhibitrices - la plupart non identifiées - avec des activités antibactériennes et antifongiques (Dortu et Thonart, 2009 ; Papagianni, 2012a). Plusieurs études ont montré que les espèces appartenant au genre *Leuconostoc*, principalement *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, peuvent inhiber la croissance de plusieurs bactéries pathogènes vu leur capacité à produire les acides organiques, le diacétyle et

les bactériocines comme dont la plus connue est la mesenterocine Y105 produite par *L. mesenteroides* (Hollet et Liu, 2011).

4-9- Production des exopolysaccharides (EPS)

Certaines espèces de *Leuconostoc* produisent des EPS de type homopolysaccharides, qui leurs confèrent des avantages technologiques très importants en industrie agro-alimentaire comme en industrie pharmaceutique (voir chapitre II).

Chapitre II : Les exopolysaccharides

1- Généralités

La plupart des cellules bactériennes sont recouvertes d'une enveloppe d'architecture similaire constituée d'une membrane cytoplasmique, d'une paroi cellulaire et éventuellement d'autres structures externes comme des couches de polysaccharides ou de protéines qui pourraient être présentes chez les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif. En particulier, la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif est constituée d'une bicouche phospholipide, dans laquelle certaines protéines sont incorporées, entourées d'une épaisse couche de peptidoglycane, qui est un polysaccharide structural (Fig. 4). Plusieurs protéines sécrétées, associées au peptidoglycane, sont présentes comme des structures complexes (les acides lipoteichoïques, les acides teichoïques et les polysaccharides). Ces derniers composants comprennent les polysaccharides capsulaires, qui restent attachés au peptidoglycane formant une capsule comme chez quelques bactéries à Gram négatif, et les EPS gluants libres, qui sont produites extracellulairement ou intracellulairement et sécrétés dans l'environnement (Holst et al., 2010). En plus de la fonction structurale, ces molécules cellulaires externes pourraient être des capteurs pour communiquer avec d'autres composantes biotiques et abiotiques des écosystèmes qu'ils habitent (Ruas-Madiedo et al., 2012).

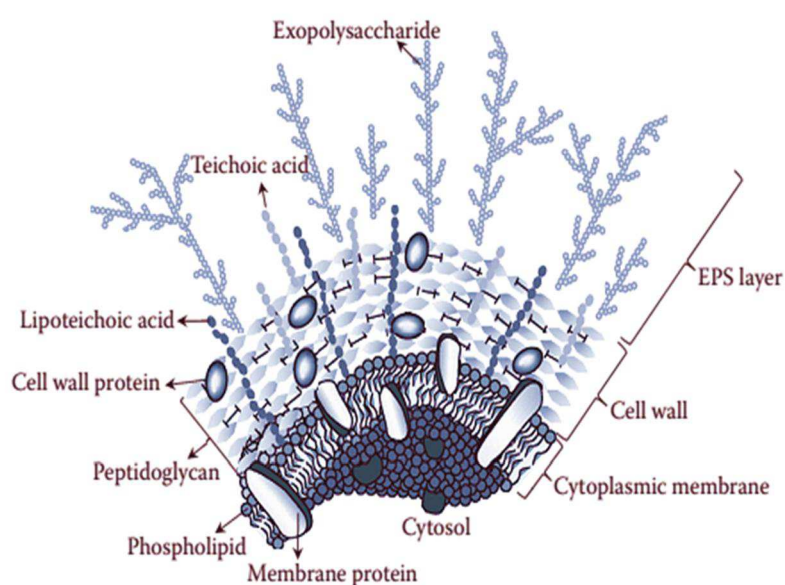


Figure 4. Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif (Ruas-Madiedo et al., 2012)

Les aliments constituent des niches complexes et riches pour plusieurs micro-organismes. Certains microorganismes sont connus par leur importance particulière dans la fabrication de plusieurs produits alimentaires dont le groupe le plus fameux est le groupe des BL. Ces dernières ont été utilisées empiriquement pendant les temps anciens pour la préservation des matières premières alimentaires dans les fermentations spontanées. À l'heure actuelle, le développement des technologies alimentaires a donné le concept de démarreurs fonctionnels, qui sont définis comme des ferments ayant la capacité à contribuer à la sécurité alimentaire et/ou offrir un ou plusieurs avantages organoleptiques, technologiques, nutritionnels ou de santé (Leroy et De Vuyst, 2004).

Il convient de mentionner que certaines espèces de ce groupe bactérien sont « généralement reconnues comme des microorganismes sûrs » selon « l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux » (FDA). De même, elles ont eu également le statut de « la présomption d'innocuité reconnue » (QPS) donné par « l'Autorité européenne de sécurité des aliments » (EFSA). Cinq espèces de *Bifidobacterium* et plusieurs espèces de BL (33 *Lactobacillus*, 3 *Leuconostoc*, 3 *Pediococcus*, *Lc. lactis* et *Streptococcus thermophilus*) ont été incluses dans la liste QPS (EFSA 2007), ce qui signifie que les souches, attribuées sans ambiguïté à un groupe QPS, peuvent être incluses dans les produits alimentaires.

De nos jours, il y a une demande remarquable par les consommateurs vis-à-vis les aliments fonctionnels, L'un de ces aliments, dont la valeur marchande est la plus élevée, est celui contenant des probiotiques. Cependant, seules quelques souches spécifiques des BL présentent des caractéristiques favorisant la santé et, dans certains cas, l'effet positif pourrait être attribuable à leurs composants de surface, comme le cas des EPS (Lee et Salminen, 2009).

2- EPS produits par les BL

Les EPS forment un groupe hétérogène de polysaccharides libérés dans le milieu extracellulaire par de nombreux êtres vivants, dont la majorité entre eux ont une appartenance d'origine microbienne, elles ont eu une importance particulière du point de vue industriel. Les polysaccharides microbiens peuvent généralement être classés par leurs fonctions biologiques provenant de leur localisation, ils existent trois groupes: (i) des polysaccharides de stockage intracellulaire (glycogène), (ii) des polysaccharides capsulaires qui sont étroitement liés à la surface cellulaire et (iii) des polysaccharides bactériens extracellulaires (comme le xanthane et le dextrane, etc.) qui sont importants pour la pathogénicité et la formation des biofilms (Schmid et al., 2015). Les EPS sont produits par *Proteobacteria* comme *Halomonas ventosae* (Martínez-Cánovas et al., 2004); par les bactéries à Gram négatif telle que *Xanthomonas campestris* (Lu

et al., 2007) et les BL comme *Pediococcus parvulus* (Notararigo et al., 2013a) et *L. mesenteroides* (Nácher-Vázquez et al., 2015) ; par les champignons et les levures comme *Schizophyllum commune* (Du et al., 2016), *Cryptococcus laurentii* (Pavlova et al., 2011) et les microalgues comme *Porphyridium cruentum* (Patel et al., 2013).

Plusieurs espèces des BL sont capables de synthétiser des polymères de nature glycosidique qui pourrait bien rester liés, à la surface des cellules de manière covalente constituant une capsule ou comme EPS. Certaines EPS confèrent aux souches productrices un phénotype mucoïde lorsqu'elles seront cultivé sur un milieu solide et sa production peut être détectée à l'aide d'une anse par la formation de filaments (Fig. 5) (Pérez-Ramos et al., 2015).

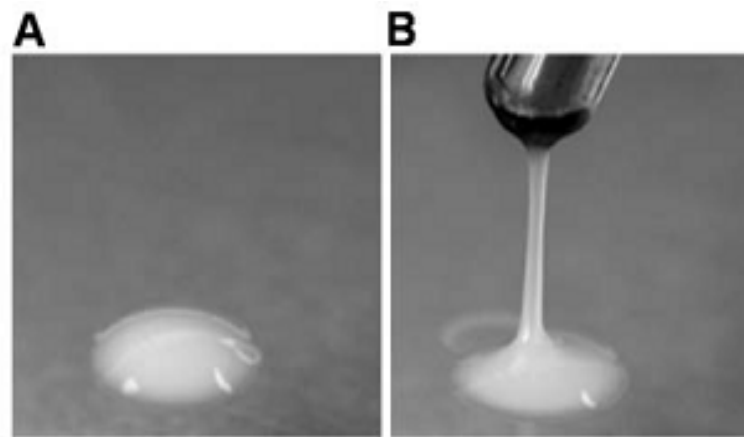


Figure 5. Colonie de *P. parvulus* 2.6R, productrice de EPS, avant (A) et après (B) le remontage avec une anse d'ensemencement en plastique (Pérez-Ramos et al., 2015).

Bien que le rôle écologique de ces EPS dans les BL n'a pas été bien élucidé, Il doit être important de noter que des études suggèrent que ces biopolymères jouent un rôle important dans (i) la protection contre les conditions environnementales défavorables, comme la dessiccation, la phagocytose, bactériophages d'attaque, des antibiotiques ou des composés toxiques et le stress osmotique, agissant comme une barrière physique ; (ii) la reconnaissance de la cellule et (iii) la colonisation de la diversité des écosystèmes, en adhérant à des surfaces telles que la muqueuse intestinale et de la formation de biofilm (Ruas-Madiedo, 2014a).

Généralement, ces EPS ne sont pas utilisés comme source d'énergie par les bactéries qui les produisent, mais il a été démontré que, entre autres, les souches *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus* sont capables de dégrader leurs EPS synthétisés (Patel et al., 2012).

EPS sont composés d'unités répétitives linéaires ou ramifiées de monosaccharides ou leurs dérivés. Ces unités sont principalement le glucose, le galactose, le mannose, la N-

acétylglucosamine, la N-acétylgalactosamine, le rhamnose et le fructose, en proportions variables, parfois avec d'autres résidus inorganiques et organiques tels que le phosphate, le sulfate, le succinate, l'acétate, le pyruvate et glycérol (Finore et al., 2014).

3- Classification des EPS

Les EPS produits par BL se diffèrent par : (i) la composition, l'introduction de différents types de liens et unités monosaccharides ; (ii) la structure avec le degré et le type de ramification ; (iii) la masse moléculaire et (iv) la conformation structurelle. On se basant sur leur composition, les EPS sont classés en deux groupes: des homopolysaccharides (HoPS), constituée d'un seul type de monosaccharide et hétéropolysaccharides (HePS) formée par deux ou plusieurs types de monosaccharides (Patel et al., 2012).

3-1- Homopolysaccharides

Les HoPS sont formés des unités répétitives à partir d'un seul type de monosaccharides : glucose, fructose ou une proportion minime du galactose, ce qui conduit à la formation de glucanes, les fructanes ou galactanes, respectivement. Les HoPS possèdent généralement des masses moléculaires beaucoup plus élevées que celles des HePS. La longueur de la chaîne principale, la liaison osidique et le degré et le type de ramification différent entre un type et un autre (Pérez-Ramos et al., 2015).

a- Glucanes (glucose):

- **α -D-glucanes:** ils ont été décrit dans les genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Weissella* et *Streptococcus*. Selon le carbone impliqué dans la liaison de la chaîne principale, les α -D-glucanes sont classés comme suit: dextrane α -(1,6), alternane α -(1,3) et α -(1,6), mutane α -(1,3), et reuterane α -(1,4), rarement α -(1,6) (Fig. 6) (Patel et al., 2012 ; Bajpai et al., 2015 ; Meng et al., 2016).
- **β -D-glucanes:** groupe hétérogène de polymères dont la production par les BL est rare, ils diffèrent par leur structure, la masse moléculaire, la solubilité, la viscosité, des α -D-glucanes. Ce groupe est limité à un petit nombre de souches associées à la fermentation de boissons alcoolisées telles que *Pediococcus parvulus*, *Oenococcus oeni* et *Lb. diolivorans*. Ces souches produisent un type de β -D-glucane avec une chaîne principale de β -(1,3) et des ramifications plus ou moins fréquentes dans la position β -(1,2) (Fernández de Palencia et al., 2009)

; Garai-Ibabe et al., 2010 ; Ibarburua et al., 2010). La cellulose bactérienne (Yang et al., 1998) et le curdlane (Kenyon et al., 2005).

b- Fructanes (fructose) : Ce groupe contient deux principaux EPS : l'inuline β -(2,1) et le levane caractérisé par une chaîne principale de liaison osidique de β -(2,6) avec des chaînes latérales β -(2,1). Le levane est un polysaccharide particulier, car il a une viscosité intrinsèque relativement faible, et en plus, ne se gélifie pas dans l'eau à température ambiante, ce type d'EPS est produit par plusieurs espèces des BL comme *L. mesenteroides*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *Lb. sanfranciscensis* et *Lactobacillus reuteri* (Patel et al., 2012).

Les enzymes responsables de la synthèse du HoPS sont les glycosides hydrolases (GH) (ou glycosidases), polymérases extracellulaires qui utilisent l'énergie de la liaison glycosidique de saccharose pour unir les glucoses ou les fructoses. En fonction de la synthèse des α -glucanes ou des fructanes se dénomment les glucane-saccharases (GS) (Fig. 6) ou les fructane-saccharases (FS), respectivement. En outre, selon le type des HoPS, ils reçoivent leurs noms spécifiques qui sont établie par la Commission des enzymes (EC) de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (UIBBM) en se basant sur la réaction catalysée et la spécificité du substrat. Ainsi, une distinction a été établie entre les dextransaccharases (EC 2.4.1.5), les alternansaccharases (EC 2.4.1.140), les inulosaccharases (EC 2.4.1.9) et levansaccharases (EC 2.4.1.10). Les mutansaccharases et reuteransaccharases sont classées avec les dextransaccharases (Leemhuis et al., 2013).

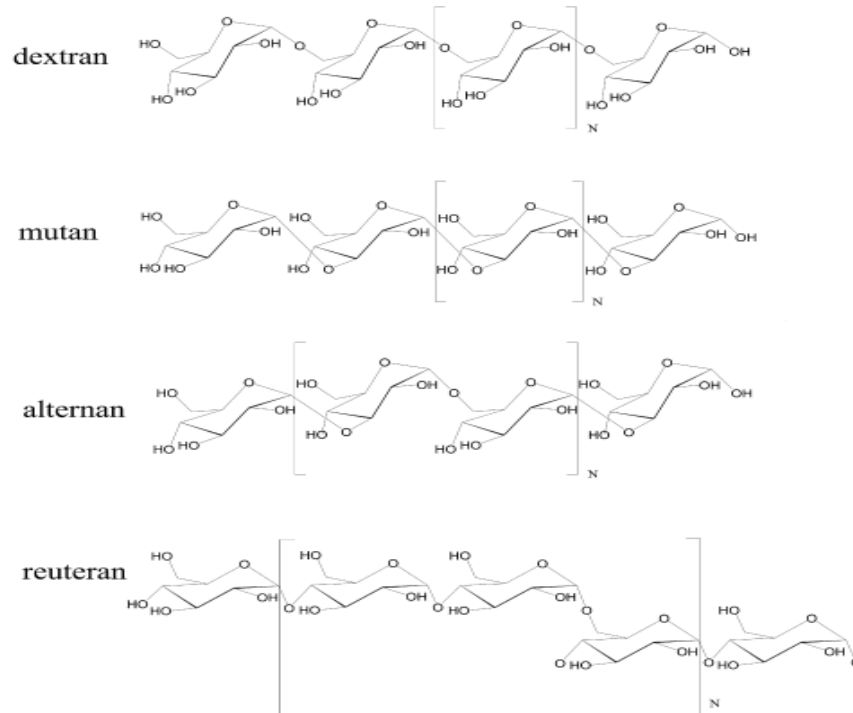


Figure 6. Structures de base des α -glucanes (dextrane, mutane, alternane et reuterane) synthétisés par les glucane-saccharases.

Les α -glucanes sont classés selon le type de liaison dominant dans la chaîne principale, cette dernière peut également contenir d'autres liaisons glycosidiques. Divers dextrans, par exemple, possèdent des liaisons α -(1,3) ou α -(1,4) dans leur chaîne principale (Tableau 1). De plus, les α -glucanes peuvent être ramifiés aux positions 2, 3, 4 et/ou 6.

Bien que FS et GS possèdent des réactions similaires vis-à-vis l'utilisation du même substrat, le saccharose, des grandes différences dans leur séquence d'acides aminés et de structure ont été observées. Par conséquent, selon le système de classification CAZy qui est basée sur la similarité de séquence (<http://www.cazy.org>), les GS font partie de la famille 70 (GH70) et FS sont membres de la famille 68 (GH68). En plus, les GS ont été décrites seulement dans les BL, tandis que les FS sont présents dans les bactéries à Gram positif, à Gram négatif et même chez les plantes et les champignons.

Tableau 1: Différents types des homopolysaccharides produits par les BL (Werning et al., 2012)

α-Glucanes			
Nom	Liaison principale	Ramifications	Espèces des bactéries productrices
Dextrane	α -(1,6)	α -(1,2) α -(1,3) α -(1,4)	<i>L. mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus animalis</i> , <i>Lb curvatus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Lactobacillus parabuchneri</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Streptococcus downei</i> , <i>Streptococcus gordonii</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>Weissella. sp.</i>
Alternane	α -(1,6), α -(1,3)	α -(1,3) (très peu)	<i>L. mesenteroides</i>
Mutane	α -(1,3)		<i>Lb reuteri</i> , <i>Streptococcus downei</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sobrinus</i>
Reuterane	α -(1,4), α -(1,6)		<i>Lb. reuteri</i>
β-Glucanes			
Nom	Liaison principale	Ramifications	Espèces des bactéries productrices
Glucane	β -(1,3)	β -(1,2)	<i>Lb diolivorans</i> , <i>Lactobacillus suebicus</i> , <i>O. oeni</i> , <i>Pediococcus damnosus</i> , <i>P. parvulus</i>
Fructanes			
Nom	Liaison principale	Ramifications	Espèces des bactéries productrices
Inuline	β -(2,1)		<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Streptococcus criceti</i> ; <i>S. mutans</i> , <i>S. ratti</i>
Levane	β -(2,6)		<i>L. mesenteroides</i> , <i>Lb pontis</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lactobacillus frumenti</i> , <i>S. mutans</i> , <i>Lactobacillus panis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sobrinus</i>

Les GH possède quatre types de domaines structuraux sur la base de sa séquence d'acides aminés à partir de l'extrémité anime (N-terminale) vers l'extrémité carboxyle (C-terminale): (i) un peptide signal; (ii) une région variable de fonction inconnue; (iii) un domaine catalytique bien préservée et (iv) une région C-terminal responsable d'un ancrage à la paroi cellulaire dans le cas des FS, ou d'une série de répétitions en tetem impliquées dans la liaison du glucane, connu sous le nom de domaines de liaison région glucane dans le GS (van Hijum et al., 2006).

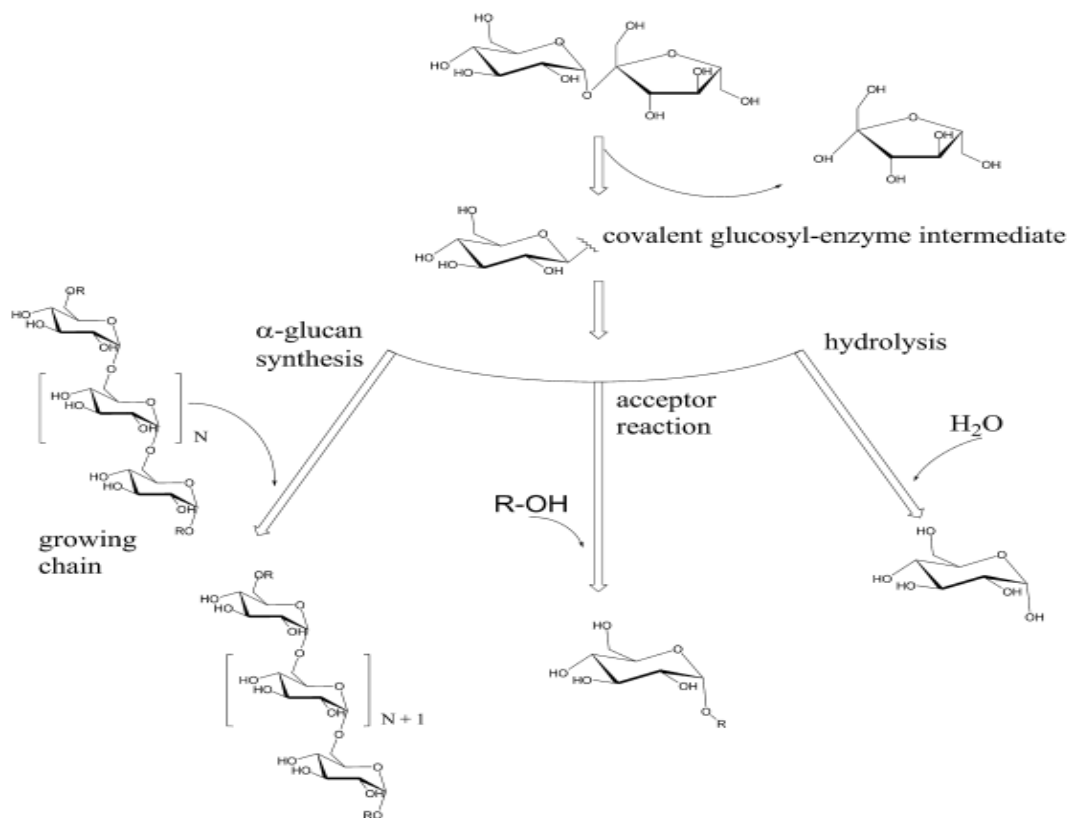


Figure 7. Trois types de réactions catalysées par les glucane-saccharase (Leemhuis et al., 2013)

Dans une alternative, il a été examiné la production d'EPS, *in vitro*, en utilisant des enzymes immobilisées, ce qui permet leur récupération et leur réutilisation afin d'améliorer leurs propriétés telles que la stabilité, l'activité, la spécificité et la sélectivité (Mateo et al., 2007). Deux activités sont souvent retrouvées chez les GS (Fig. 7) en fonction de la présence d'un accepteur d'unités glycolyses. La présence de ce dernier favorise la synthèse des oligosaccharides (de faible poids moléculaire) qui sont connus par leur effet prébiotique (Monsan et al., 2001).

3-2- Hétéropolysaccharides

Les HePS sont composées de deux ou plusieurs monosaccharides différents (de 3 jusqu'au 8) (Georges et François-Marie, 2008), leurs unités peuvent être très complexes dont la chaîne principale peut être formée de différents monosaccharides liés par divers types de liaisons avec des ramifications menant à des chaînes latérales de différentes longueurs, différente composition ainsi que différente structure (Mozzi et al., 2006). Les plus courants monosaccharides entrant dans leur composition sont le D-glucose, le D-galactose et du L-rhamnose et, dans une moindre mesure, ils peuvent aussi avoir des monosaccharides N-acétylés (N-acétyl-galactosamine et la N-acétylglucosamine), le mannose, le fructose, l'acide glucuronique, le ribose et substituants non glucosidiques comme le phosphate, l'acétyle et le glycérol (De Vuyst et Degeest, 1999a, De Vuyst et al., 2001). Les espèces et sous-espèces des BL, capables de produire des HePS, appartiennent aux genres *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* (Baruah et al., 2016). Ainsi que plusieurs espèces appartenant au genre de *Bifidobacterium* (Salazar et al., 2012).

4- Détection et production des EPS

Certaines BL produisent des EPS facilement détectables car ils confèrent à la culture un aspect muqueux ou un phénotype filamenteux. Cependant, il y a beaucoup d'EPS qui passent inaperçus, ce qui est dû à leur production en quantités insignifiantes ou à leur nature même. Alternativement, pour détecter la capacité des souches à produire des EPS, il se réalise souvent par PCR en utilisant des amorces spécifiques visant les gènes liés à leur synthèse (Ruas-Madiedo et al., 2007 ; Hidalgo-Cantabrana et al., 2015). Ceci est très utile pour le suivi d'une grande collection de bactéries et pour la sélection des souches potentiellement productrices. Dans certains cas la détection des gènes ne signifie pas nécessairement la synthèse des EPS, ce qui montre la nécessité de passer par la production (Palomba et al., 2012). Pour cela on utilise des techniques telles que la microscopie électronique (Hassan et al., 2003 ; Goh et al., 2005), ce qui permet la détection au niveau cellulaire, ou par des méthodes quantitatives, comme la méthode de phénol-acide sulfurique (Dubois et al., 1956), qui quantifie les EPS à partir des surnageants bactériens.

En ce qui concerne le niveau de la production, habituellement pour HoPS, sous conditions non optimisées, la production est inférieure à 1 g L^{-1} , étant encore plus faible pour HePS (de 25 à 600 mg L^{-1}), à quelques exceptions comme dans le cas de *Lb. rhamnosus* RW-9595M, qui, dans des conditions optimales peut produire 2 g L^{-1} HePS (Ruas-Madiedo, 2014b). Les faibles

niveaux de production d'EPS par BL sont l'un des principaux inconvénients de l'exploitation industrielle. Étant donné que ces niveaux sont déterminés par la composition du milieu (sources de carbone, oligo-éléments, vitamines, azote, etc.) et des conditions ambiantes (température, pH, oxygène, etc.) (Dueñas et al., 2003). Des efforts industriels sont basés sur l'optimisation des conditions de culture pour l'obtention la production accrue.

Dans le cas des α -glucanes, les paramètres qui doivent être contrôlé pour obtenir des rendements plus élevés sont principalement la concentration du saccharose, le pH et la durée d'incubation. Il a été démontré que *L. mesenteroides* CMG713 est capable de produire jusqu'au 6 g L⁻¹ de dextrane, après 20 h d'incubation à 30 °C, à un pH 7 et en présence de 15% de saccharose (Sarwat et al., 2008) et 50 g L⁻¹ à partir de *L. garlicum* PR (Capek et al., 2011). Pour les β -glucanes l'optimisation des conditions de croissance est insuffisante. Plus précisément, dans le cas de la β -glucane avec une chaîne principale β -(1,3) et des ramifications β -(1,2), synthétisé par la glycosyltransférase codée par le gène *gtf*, une production plus élevée a été obtenu par l'expression hétérologue du gène *gtf* de *P. parvulus* 2.6 en *Lc. lactis* NZ9000. Pour cela, le gène a été cloné dans des multicopies sous le contrôle du promoteur du gène *nisA* lactococcal, ce qui a permis l'expression inductible du gène *gtf* présent dans le plasmide pNGTF dans des bactéries portantes, par l'addition de la nisine au milieu de culture (Werning et al., 2008 ; Werning et al., 2012). L'EPS synthétisé par *Lc. lactis* NZ9000[pNGTF] recombinante possède la même structure que celle synthétisée par *P. parvulus* 2.6, avec des niveaux de production légèrement plus élevés (550 mg L⁻¹ face à 350 mg L⁻¹), mais aussi avec la souche recombinante produit un EPS plus pur (Notararigo et al., 2013b). Cela production pourrait être augmenté en optimisant les conditions de culture de la souche recombinante.

Dans de nombreux produits alimentaires, les EPS possèdent un lieu in situ, dans les matrices alimentaires, comme dans le cas du yaourt, un produit laitier fermenté par *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *S. thermophilus*, qui produisent de 60 à 150 mg L⁻¹ et 30 à 890 mg L⁻¹ des HePS, respectivement (Marshall et Rawson, 1999). De même, les HePS produits in situ par *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus* et *Lb. casei* dans le fromage, contribuer dans la qualité organoleptique ainsi que les caractéristiques rhéologiques de ce produit laitier (Broadbent et al., 2001). Dans le kéfir, boisson typique des pays de l'Est d'Europe, les EPS jouent un rôle important dans la prolifération des populations microbiennes. Sa fermentation est assurée par les BL, les levures, responsables de la production de l'acide lactique et l'éthanol, respectivement. L'une des espèces typiques de ce produit est *Lactobacillus kefiranofaciens* qui métabolise l'éthanol pour produire kefirane, un biopolymère résistant à la dégradation enzymatique, possédant une application potentielle importante dont il joue le rôle d'épaississant

dans les produits fermentés (Maeda et al., 2004). Plusieurs propriétés fonctionnelles ont été attribuées au kéfir, telles que la capacité de moduler la réponse immunitaire, de diminuer les réactions allergiques et d'inhiber la croissance des tumeurs (Liu et al., 2002).

L'utilisation des bactéries productrices des EPS dans les yogourts améliore la rétention d'eau, ce qui confère au produit une meilleure texture et consistance, sans altérer les caractéristiques organoleptiques. C'est une méthode alternative pour éviter l'addition de stabilisants qui est interdite dans de nombreux pays. Il est généralement considéré que la formation d'EPS et de ses interactions avec la caséine sont les points clés pour améliorer la texture (Badel et al., 2011). La sélection des souches productrices des EPS comme des démarreurs de fermentation est une stratégie pour développer des produits offrant au marché et aux consommateurs une valeur ajoutée fournie par les EPS, principalement leur fonctionnalité (De Vuyst et Degeest, 1999b).

5- Isolement, purification et caractérisation des EPS

5-1- Isolement et Purification des EPS

L'analyse structurale des EPS, ainsi que l'étude de leur potentiel bioactif exigent l'étape de purification, cela signifie la nécessité de les séparer des contaminants (principalement protéines, ADN et ARN) (Fig. 8). La purification des EPS à partir d'une culture bactérienne requiert l'élimination de bactéries productrices et le reste des composants des milieux avec les métabolites synthétisés, bien sûr, en utilisant des méthodes adéquates afin de préserver les EPS (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005, Werning et al., 2012).

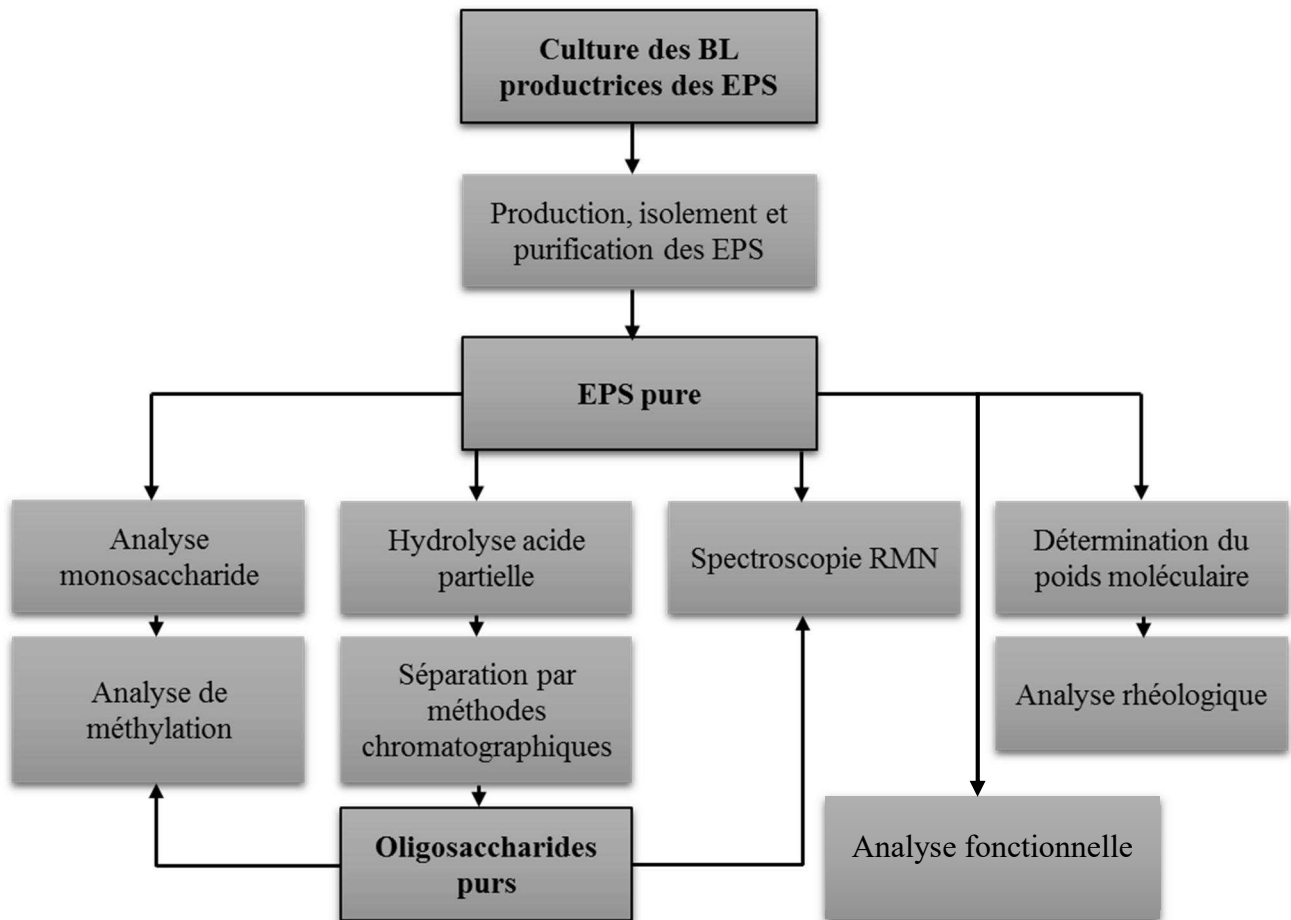


Figure 8. Stratégie générale de l'analyse des polysaccharides extracellulaires produits par les BL (Leemhuis et al., 2013)

En général, la complexité de la méthode utilisée pour l'isolement et la purification du EPS dépendra de la composition du milieu de culture employé. Les milieux de production les plus utilisés sont principalement le lait écrémé, le lactosérum et les milieux à base de lactosérum (matrices alimentaires). Il est bien établi que les conditions de culture et la composition (non seulement la source de carbone) des milieux de culture influent sur le rendement des EPS et sur leurs caractéristiques moléculaires. Par conséquent, le choix d'un support de production d'EPS adéquat a une grande importance, étant donné que certains de leurs composants pourraient interférer avec l'analyse des EPS. Dans ce sens, Kimmel et Roberts (1998) ont montré que l'extrait de levure, l'extrait de viande et les peptones représentaient 94% de l'équivalent de fond total d'EPS dans le bouillon MRS utilisé pour cultiver la souche *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR. Vaningelgem et al. (2004) ont indiqué que les glucomannanes présents dans les extraits de levure et les peptones sont des matériaux de nature glucidique-polymère qui pourraient interférer avec la quantification et être co-purifier avec les EPS. Des milieux

chimiquement définis et semi-définis, dépourvus de ces composants, contenant une source de carbone, des acides aminés, des vitamines, des bases d'acides nucléiques et des sels minéraux ont été développés pour faciliter l'analyse des EPS (Degeest et al., 2001).

La procédure la plus simple implique une dialyse du milieu cultivé contre l'eau (après élimination des cellules par centrifugation), suivie d'une lyophilisation. Cette technique a été utilisée pour isoler EPS de quelques *Lc. lactis* subsp. *cremoris* cultivées dans des milieux chimiquement définis (Marshall et al., 1995). La précipitation à l'éthanol peut être utilisée pour concentrer l'EPS avant la dialyse, cette précipitation est également une méthode d'élimination des contaminants. L'utilisation d'un volume d'éthanol défavorise la précipitation des métabolites et des composants de petite taille, d'ADN et d'ARN.

Lorsque le milieu de culture sera plus complexe, des étapes supplémentaires de purification sont devenues nécessaires pour réduire la teneur en protéines et d'autres composants dans la préparation finale des EPS. Pour les EPS obtenus à partir de milieux à forte teneur en protéines (par exemple, lait écrémé), trois approches sont couramment utilisées : (i) la précipitation des protéines avec des quantités variables de l'acide trichloroacétique (TCA) (concentration finale allant de 4 à 14%), (ii) la digestion protéines par des protéases, ou (iii) la combinaison des deux. En outre, les procédés de purification doivent être adaptés selon le mode de la synthèse des EPS (EPS synthétisé ou sécrété à l'extérieur ou resté de manière covalente ou faiblement lié à la paroi cellulaire). Dans le cas d'une sécrétion extérieure, les surnageants de culture sont soumis à des cycles de précipitation avec l'éthanol ou l'acétone et enfin l'EPS est dissous dans l'eau, en fonction de leur solubilité (Ibarburu et al., 2015). Lorsque la production d'EPS est faible, l'isolement sera effectué à partir des cultures en milieu solide et traité dans des conditions douces, pour libérer les EPS faiblement attachées au mur, sans provoquer la lyse cellulaire. Ainsi, par centrifugation, les cellules sont séparées du surnageant et ensuite l'EPS est récupéré par précipitation avec de l'acétone ou de l'alcool (Salazar et al., 2012).

5-2- Composition des monomères et types des liaisons glycosidiques des EPS

La caractérisation structurale des EPS implique l'utilisation des techniques spécifique visant à déterminer la composition en monosaccharides, configuration (α ou β) et les types de liaison qui les caractérisent. La composition monosaccharide est déterminée par dépolymérisation d'EPS par une hydrolyse acide totale en utilisant l'acide trifluoroacétique (Notararigo et al., 2013), l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique et par la suite, les produits d'hydrolyse sont analysés par des techniques chromatographiques.

L'analyse des monosaccharides est également utilisée pour déterminer la teneur en glucides, en vérifiant la pureté de l'échantillon. Dans le cas des polysaccharides produits par l'action de GS, il est évident que ce sont des polymères composés de résidus α -D-glucose (Leemhuis et al., 2013). Type de liaison osidique est généralement déterminé par analyse de la méthylation, qui comprend la méthylation des EPS, leur hydrolyse et leur réduction au borohydrure de sodium deutéré suivie par une acétylation pour compléter l'analyse par chromatographie gaz-liquide couplé d'une spectrométrie de masse (Van Calsteren, 2002). Les pourcentages (rapport) des unités de glucose terminales, internes et ramifiées déterminées par l'analyse de méthylation, donnent déjà une indication de la structure du glucane (Leemhuis et al., 2013).

5-3- Fragmentation des EPS

Pour élucider la structure des grands polymères comme les α -glucane, il est souvent nécessaire de préparer des oligosaccharides à partir des polysaccharides natifs par une hydrolyse acide et/ou enzymatique douce. De tels oligosaccharides sont préférables dans l'analyse par spectroscopie RMN due à leur résolution améliorée, en particulier lorsque les solutions de la molécule mère sont très visqueuses. Dans certains cas, des techniques comme la dégradation enzymatique, l'acétolyse et/ou l'oxydation par periodate peuvent être utiles pour révéler des informations structurelles supplémentaires sur les HoPS (Slodki et al., 1986). La dégradation de Smith sépare sélectivement les polysaccharides (contenant des liaisons α -(1,3)) par trois étapes consécutives: l'oxydation avec le periodate, suivie d'une réduction en un polyalcool avec le borohydrure, et enfin, une hydrolyse acide douce (Kristiansen et al., 2010). Finalement, en combinant les données ^1H RMN de polysaccharides avec les données d'analyse de méthylation, ainsi que des informations structurales des oligosaccharides obtenus, un modèle composite comprenant toutes les caractéristiques structurelles peut être formulé. Jusqu'à présent, ces études détaillées ont été réalisées pour le dextrane et le reuterane synthétisés par *Lb. reuteri* GTF180 et autres (van Leeuwen et al., 2008a ; van Leeuwen et al., 2008b). Bien que des dizaines de polymères de glucanes formés par l'action des GS aient été étudiés par l'analyse de méthylation et/ou spectroscopie RMN (Fig. 7) (Bounaix et al., 2009 ; Purama et al., 2009 ; Irague et al., 2011 ; Díez-Municio et al., 2012), leur analyse structurale détaillée est incomplète.

5-4- Spectroscopie RMN

La RMN est une méthode spectroscopique d'analyse de la matière, fondée sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. L'échantillon à étudier, placé dans un champ magnétique très intense, acquiert une aimantation nucléaire qui est détectée par sa mise en résonance avec un champ électro-magnétique. La réponse de l'échantillon dépend de l'intensité du champ magnétique appliqué, de l'environnement électronique des noyaux et de la dynamique des mouvements atomiques. Des informations supplémentaires sur les caractéristiques structurales du glucane peuvent être obtenues par spectroscopie de RMN ^1H et ^{13}C . Cette spectroscopie à haute résolution est la méthode la plus puissante pour l'identification de Glucides (Leemhuis et al., 2013). C'est la seule méthode non destructive qui peut fournir tous les détails, comprenant le type de monosaccharides constitutifs, y compris la taille de l'anneau, la configuration anomérique, et la position des liaisons glycosidiques. Les spectres RMN sont habituellement enregistrés dans D_2O et les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par référence à l'acétone interne (2.225 pour ^1H et 31.08 pour ^{13}C), à une température de sonde de 300 K. Des températures plus élevées (par exemple 330 K) sont souvent utilisées pour réduire la viscosité et augmenter la solubilité de l'échantillon. La température plus élevée déplace également le signal Hydrogene-Oxygene-Deutérium (HOD) vers le haut dans le cas des signaux de protons à $\sim 4,8$ ppm, bien que cela ne soit normalement pas nécessaire lors de l'étude des glucanes. Notons que les spectres de RMN ^1H des α -glucanes peuvent être améliorés par la présence d'une petite quantité d'acide trifluoroacétique deutéré (Tizzotti et al., 2011).

5-5- Détermination de la masse moléculaire

Les caractéristiques physiques et la capacité des polysaccharides à conférer une viscosité à une solution aqueuse ou à des produits de fermentation sont déterminés par les paramètres moléculaires des biopolymères comme la composition chimique, la longueur de chaîne et sa masse moléculaire (Ruas-Madiedo et al., 2002). La masse moléculaire de EPS microbienne est influencée par plusieurs facteurs tels que les conditions de culture, méthode d'isolement et de la technique de purification (De Vuyst et Degeest, 1999). En outre, les souches de la même espèce peuvent produire des EPS ayant des masses moléculaires différentes. Ce fait a été observée entre la des EPS synthétisées par les BL *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *S. thermophilus* (Mozzi et al., 2006).

Les EPS des BL sont divisés en deux groupes, les EPS de faible poids moléculaire avec des valeurs inférieures à 10^6 Da et les EPS de haut poids moléculaire avec des valeurs supérieures à 10^6 Da (Mozzi et al., 2006).

La gamme de poids moléculaire de HePS des BL est comprise entre $1,0 \times 10^4$ Da et $9,0 \times 10^6$ Da (Vaningelgem et al., 2004), bien qu'il ait été détecté une production d'EPS par *Lb. helveticus* BCRC14030 avec un poids moléculaire plus élevé, de l'ordre de $2,6 \times 10^7$ Da (Lin et Chien, 2007). Les HoPS synthétisés par les BL appartiennent au groupe des EPS avec un poids moléculaire élevé. Le dextrane qui est le premier EPS des BL commercialisé, présente un poids moléculaire compris entre 1×10^7 to 1×10^8 Da (Vettori et al., 2012).

Les EPS sont des polymères polydispersés. Dans certains cas, en fonction de la taille de l'EPS (inférieure à 1×10^6 Da) le fractionnement avec chromatographie d'exclusion de taille (size exclusion chromatography, SEC) peut être appliqué, en utilisant une courbe d'étalonnage avec des composés de taille connue (bleu dextrane, dextrane T500, T70, T10 et de la vitamine B12) (Notararigo et al., 2013a). Différentes techniques sont disponibles pour la détermination de la masse moléculaire des polymères connus par une taille élevée, habituellement basé sur le temps de rétention du polysaccharide élué par chromatographie d'exclusion stérique haute performance couplée à la détection d'indice de réfraction et/ou avec détecteur de diffusion de lumière laser multi-angle (Picton et al., 2000). Cependant, il a été rapporté que des polysaccharides de masse moléculaire ultra-élevée comme l'alternane ou l'amylopectine peuvent se dégrader lors de leur passage dans les colonnes SEC (Striegel et al., 2009). Pour résoudre ce problème, on peut utiliser trois autres techniques, le fractionnement par écoulement de champ et la chromatographie hydrodynamique, qui sont à la fois plus rapides et plus douces que la SEC (Isenberg et al., 2010). Le fractionnement asymétrique du champ d'écoulement a été aussi utilisé avec succès pour la séparation des glucanes de type amidon.

5-6- Propriétés rhéologiques des EPS

La plupart des aliments sont soumis à des variations de température pendant la transformation, le transport, le stockage et la consommation. Les changements de température peuvent affecter les propriétés physico-chimiques des produits alimentaires, qui influent généralement sur les propriétés générales du produit fini, son goût, son aspect, sa texture, sa consistance et sa stabilité. Pour cela sera important de comprendre le comportement des ingrédients composant le produit fini, comme les polymères, en étudiant leurs propriétés rhéologiques.

La rhéologie est la science qui étudie les phénomènes de déformation et de l'écoulement des solides et des fluides sous l'influence des forces mécaniques. Souvent, ces phénomènes déterminent les propriétés fonctionnelles des aliments (Cheftel et al., 1988).

D'après leur comportement rhéologique, les fluides y compris les solutions des polymères peuvent être classés comme Newtonien et pseudo-plastique (non Newtonien) (Fig. 9).

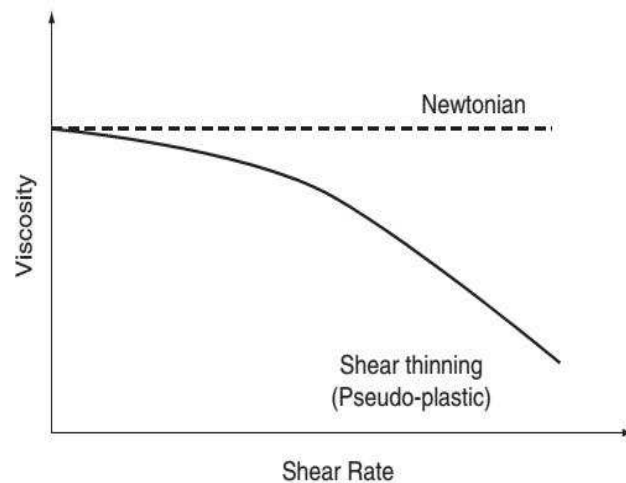


Figure 9. Comportement de viscosité newtonienne et pseudo-plastique en fonction du taux de cisaillement (Kontopoulou, 2011)

Le premier suit la loi de Newton (Eq. 1) ou l'effort de cisaillement (τ , contrainte de cisaillement) appliquée est directement proportionnelle à la vitesse de déformation ($\dot{\gamma}$, taux de cisaillement). Ainsi, la viscosité (η) est constante quelle que soit la contrainte appliquée, ce qui est appelée la PMA (η_0).

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad \text{Eq. 1}$$

Le fluide liquide Newtonien est incapable de récupérer, même partiellement, sa forme initiale lorsque la force appliquée est enlevée. Cela signifie que l'énergie mécanique fournie au système, se dissipe comme chaleur, au lieu d'être emmagasinées comme le cas des autres comportements. Ce type de fluide est rencontré chez les gaz et les liquides de faibles poids moléculaires (Fauduet, 2011).

Contrairement à ce qui précède, les fluides non-Newtoniens ne présentent pas une relation linéaire entre la contrainte et la vitesse de déformation.

L'une des propriétés les plus notables de liquides macromoléculaires est la viscosité non Newtonienne, autrement dit, la viscosité du fluide change avec la vitesse de cisaillement. Pour sa détermination, des tests de flux continu doivent être établis en appliquant un gradient de contrainte. Pour mieux comprendre le comportement rhéologique en flux continu de ces systèmes, il est important d'introduire le concept viscosité apparente (η).

La viscosité, qui est une mesure de la friction interne d'un liquide, est un paramètre très important dans l'étude de l'écoulement des polymères, présente une relation très étroite avec les paramètres suivants : (i) le poids moléculaire du polymère ; (ii) la température ; (iii) la pression ; (iv) le taux de cisaillement et (v) la concentration du polymère. Pour la déterminer, on applique une force mesurable sur le polymère en solution en mesurant en même temps la vitesse de déformation (Shenoy, 1999).

Certains polymères n'obéissent pas à la loi de Newton. Leur viscosité apparente diminue que le taux de cisaillement augmente, cette propriété est appelée la pseudo-plasticité, ce genre de polymères nécessitent une valeur de seuil de contrainte de cisaillement pour commencer à se déformer (Kontopoulou, 2011). Ce type de fluide est rencontré chez les caoutchouc, les émulsions peu chargés, les suspensions et les dispersions (Fauduet, 2011).

Dans le cas des polymères, ce phénomène est expliqué par la dissociation des chaînes. Les molécules au repos sont enchevêtrées formant un réseau tridimensionnel qui se sépare par application d'un cisaillement. La rupture du réseau provoque moins de frottement entre les molécules, donc moins de viscosité (Paraschivoiu et al., 2003).

Les caractéristiques pseudo-plastiques d'un fluide ne doivent pas être uniformes dans toute la gamme de vitesses de déformation, existant par exemple, un type de comportement qui présente trois régions distinctes, comme l'indique la Fig. 10 :

- Région I (RI), comportement linéaire ou Newtonien : observée à des taux de cisaillement faibles. Dans cette région, la viscosité est indépendante du cisaillement et elle est appelée aussi la viscosité Newtonienne (η_0). Etant donné que les polymères sont des macromolécules constituées de matériaux enchevêtrés, dont l'effet de cisaillement est très faible et, par conséquent il n'affecte pas la structure.

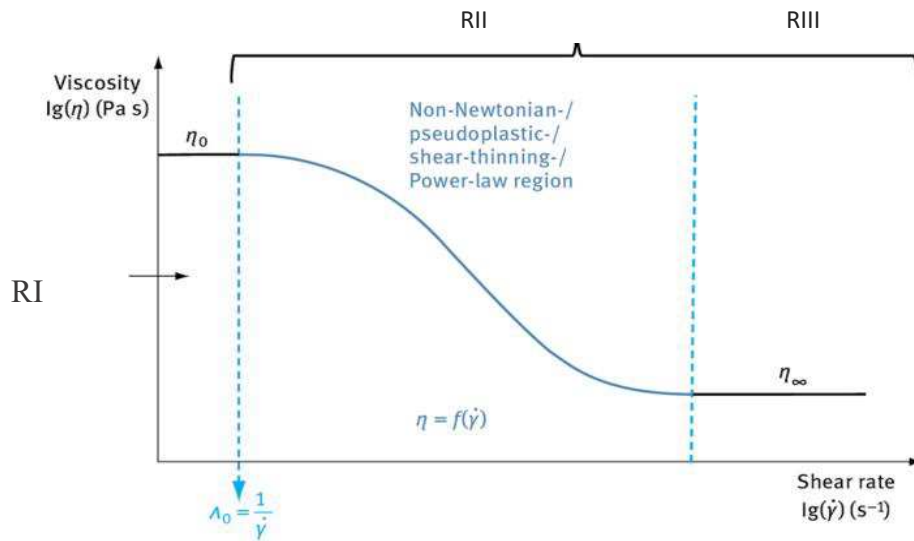


Figure 10. Comportement pseudo-plastique des solutions de polymères illustré par la viscosité en fonction de taux de cisaillement (Agarwal et al., 2016).

- Région II (RII), comportement pseudo-plastique : à des vitesses de déformation intermédiaire, le matériel présente un comportement non-linéaire. Dans cette région, la viscosité diminue en fonction de la force de cisaillement et cela est dû à la séparation des chaînes de polymère. Le moment spécifique auquel commence la déformation par cisaillement (temps minimum pour que l'enchevêtrement se rétablisse complètement) est appelé temps de retardement caractéristique (A_0) et il est défini comme la valeur inverse de la vitesse de cisaillement à ce point.
- Région III (RIII), Comportement linéaire : à des taux de cisaillement suffisamment élevés, les molécules dissociées sont orientées dans le sens d'écoulement, de sorte que l'interaction mutuelle est constante et minimale où l'alignement des chaînes de polymères est à son maximum. En conséquence, une zone linéaire caractérisée par une viscosité limite (viscosité de cisaillement infinie, η_∞) est détectée en fournissant une seconde région Newtonienne (Ortiz-Rodríguez, 2013 ; Agarwal et al., 2016).

Des enchevêtrements plus élevés peuvent être obtenus de deux manières différentes : en augmentant la concentration en polymère dans une solution ou en utilisant des polymères ayant des degrés de polymérisation plus élevés (Han, 2007).

Certain nombre de modèles empiriques sont utilisés pour décrire le type du comportement des fluides. Dans une certaine gamme de taux de cisaillement (Eq. 2), la viscosité peut être représenté comme une loi de puissance (Koszkul et Nabialek, 2004) :

$$\eta = K. \dot{\gamma}^{n-1} \quad \text{Eq. 2}$$

K, est l'indice de consistance et n, indice d'écoulement. Ainsi, si :

- $0 < n < 1$, le fluide est pseudo-plastique ;
- $n = 1$, le fluide est Newtonien ;
- $n > 1$, le fluide est rhéoépaississant ou dilatat.

Ce dernier cas signifie le sens contraire d'un fluide pseudo-plastique, c'est à dire que la viscosité augmente avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement. Ce type de comportement est remarqué chez les suspensions d'amidon ou de mica dans l'eau ainsi que les purée de tomate et de banane (Fauduet, 2011).

D'autres modèles bien connus sont disponibles en se basant aussi sur la fonction viscosité. Il est important de choisir un modèle qui soit à la fois précis sur la plage de traitement et pour lequel les données peuvent être facilement obtenues comme modèle Ellis, modèle Carreau, modèle Cross, dont le but est de correspondre le plus possible au comportement observé du matériel (Koszkul et Nabialek, 2004).

a- Effet de la concentration de polymère

La viscosité d'un fluide peut être influencée par des facteurs tels que la concentration, la température, le pH, la présence de sels, le poids moléculaire, etc. A cet égard, il est à noter que, pour de nombreuses solutions de polymères, la viscosité Newtonienne augmente avec la concentration et à partir d'une certaine valeur, appelée concentration critique ($C^* = C_{crit}$), qui signifie la concentration de polymère à laquelle la sphère équivalente d'une molécule de polymère donnée touche juste la sphère équivalente de sa molécule voisine la plus proche, l'augmentation de la viscosité sera plus prononcée (Fig. 11). Ce comportement peut être expliqué comme une conséquence d'un extensive enchevêtrement des chaînes polymères, ce qui se produit à partir de cette concentration (Kulicke et Clasen, 2013, Agarwal et al., 2016). La relation directe entre la viscosité et la concentration permet l'extraction d'autres informations et donnés rhéologiques complémentaires nécessaires, principalement le nature de chaîne du polymère (rigide ou flexible) (Velasco et al., 2009).

Les polysaccharides présentent généralement un comportement viscoélastique y compris les biopolymères bactériens, ce qui leur a permis d'être utilisés efficacement dans l'industrie alimentaire, pour fournir une texture et des propriétés sensorielles appropriées au produit, en particulier les produits laitiers comme les yaourts et les laits fermentés (Lapasin et Priel, 1995).

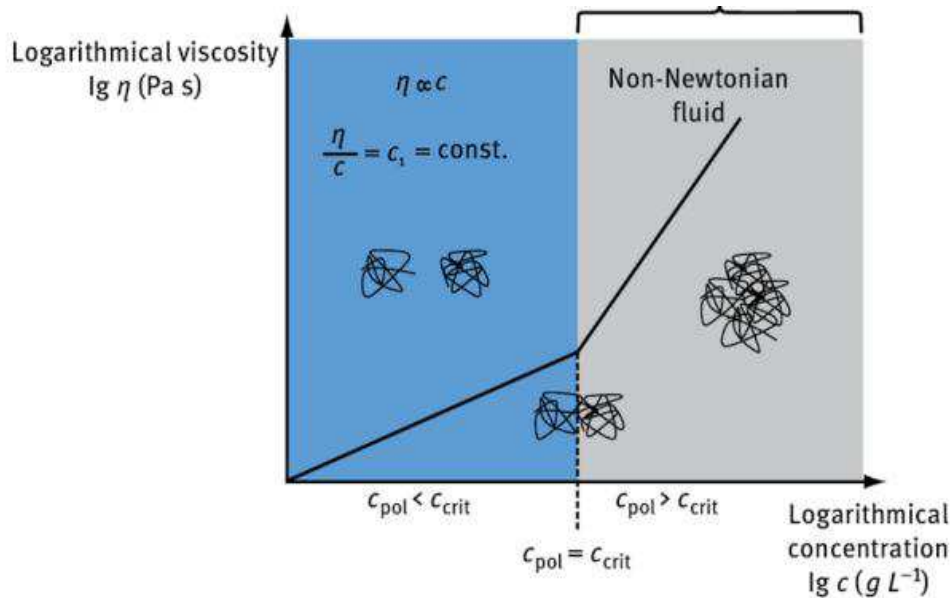


Figure 11. Viscosité en fonction de différentes concentrations des solutions du polymère.

C_{pol} , concentration du polymère; C_{crit} , concentration critique (Agarwal et al., 2016).

Plusieurs études ont montré que le dextrane possède un comportement pseudo-plastique sous des conditions de cisaillement avec des chaînes de nature flexible (Moosavi-Nasab et al., 2010 ; Kothari et al., 2015). Cette propriété pseudo-plastique est importante pour obtenir de bonnes propriétés sensorielles et organoleptiques, principalement la texture. En outre, cette propriété est importante pour divers procédés impliqués dans la transformation des produits alimentaires, tels que le mélange, le versement et le pompage, où différents taux de cisaillement opératoires sont appliqués. En plus, il a été rapporté que les polysaccharides avec un comportement pseudo-plastique, non-Newtonien, sont plus adaptés pour la fabrication de différents produits alimentaires comme les gâteaux, les vinaigrettes, les sauces, les sirops, les puddings et les produits laitiers. Ces polymères peuvent également être utilisés dans le dentifrice et les cosmétiques tels que les crèmes, les gels de contour des yeux (Jindal et al., 2011 ; Kothari et al., 2015).

Un matériel élastique idéal se comporte de façon que, quand la force appliquée est enlevée, revienne à sa forme initiale quelle que soit l'intervalle de temps d'application. Cependant, un liquide de nature Newtonienne ne récupère pas sa forme originale après le retrait de la force

appliquée. La méthode la plus simple d'étudier le comportement viscoélastique d'un polymère est la réalisation des essais sous des conditions de viscoélasticité linéaire, un comportement qui se caractérise par des dépendances linéaires entre la contrainte, la déformation et le temps. Les mesures mécano-dynamique ou oscillatoires d'une petite amplitude, permettant de déterminer l'efficacité des composants élastiques et visqueux, dans des essais où la destruction de la structure de la matière est faible ou nul. Celles-ci consistent à appliquer une contrainte de cisaillement ou une déformation qui varie avec le temps, mais avec la même fréquence (Jean-Luc, 2013).

6- Applications des EPS

Parmi les applications industrielles potentielles d'EPS produit par les BL est leur rôle d'agents épaississants, des stabilisants, des émulsifiants, des agents gélifiants et/ou viscosifiant dans l'industrie médicale, pharmaceutiques et même dans la fabrication des cosmétiques (Sanlibaba et Çakmak, 2016). Sa présence dans les aliments améliore les propriétés rhéologiques et organoleptiques des produits fermentés (tels que les produits laitiers) dont ils ont plusieurs usages : (i) contrôlent la viscosité et modifient le flux, (ii) améliorent la texture, sensation de bouche et la stabilité de congélation-décongélation, (iii) épaississants, (iv) agents de suspension, (v) produits alimentaires de faibles calories, (vi) fibres alimentaires, (vii) films et agents de revêtement, (viii) glaçage des aliments congelés, et (ix) agents hydratants (Bajpai et al., 2015). En outre, certains ont des effets bénéfiques sur la santé, tels que la capacité d'abaisser le taux de cholestérol sanguin, réduire la formation de biofilm, en plus de leurs activités immunomodulatrices, antitumorales, antigastrites et antiulcéreux (Patel et Prajapati, 2013).

Les EPS peuvent également être utilisés comme source d'oligosaccharides et de monomères de sucre (Freitas et al., 2011). Une variété d'oligosaccharides fonctionnels peut être produite par les BL. Ces oligosaccharides ont d'énormes applications industrielles comme des prébiotiques, des nutraceutiques, des édulcorants, des humectants, des composant luttant contre le cancer du côlon, des stimulateurs immunitaires (Patel et al., 2012).

Les EPS microbiens jouent aussi un rôle dans la protection de la cellule microbienne productrice dans leur milieu naturel contre la condition défavorable comme l'attaque de phage, le manque de nutriments, le stress osmotique, les antagonistes, les composés toxiques et la dessiccation, sans oublier le rôle de la capsule dans la protection, l'adhésion et la colonisation des plusieurs niches écologiques (Patel et Prajapati, 2013).

Les EPS, à la fois des HoPS et des HePS, synthétisés par les BL sont utilisés comme prébiotiques diététiques, qui sont des ingrédients sélectivement fermentés entraînant des changements spécifiques dans la composition et/ou l'activité du microbiote gastro-intestinal, conférant ainsi un ou plusieurs avantages sur la santé de l'hôte, selon l'Association Internationale des probiotiques et prébiotiques (AIPP, 2008). Ces polymères extracellulaires synthétisés par certains habitants de l'intestin semblent être résistants à la digestion gastro-intestinale ; Ils sont également sensibles à la biodégradabilité par le microbiote intestinal en fonction des caractéristiques physico-chimiques de l'EPS et des d'enzymes glycolytiques synthétisées par le microbiote. Par conséquent, bien que la composition chimique de ces HoPS et HePS soit différente, les deux peuvent être des substrats fermentescibles par les habitants intestinaux et de bons candidats en tant que substrats prébiotiques potentiels. Cependant, il existe des limites pour leur utilisation comme additifs dans l'industrie alimentaire en raison de leur faible rendement dans la production et, d'autre part, il y a un manque d'études cliniques démontrant la fonctionnalité de ces biopolymères (Salazar et al., 2016).

L'un des principaux inconvénients de l'utilisation comme additifs alimentaires est le faible niveau de la production par rapport à d'autres polysaccharides obtenus à partir de plantes ou d'autres bactéries sans qualité alimentaire. Il est donc essentiel d'élaborer des procédures pour suivre la croissance dans des milieux de culture peu coûteux, d'améliorer des performances de production et de récupération des EPS.

7- Le dextrane et la dextrane-saccharase

7-1- Le dextrane

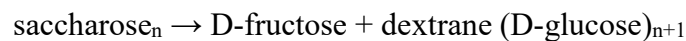
Le mot dextrane a été utilisé pour la première fois en 1874 par Scheibler et cela pour étudier la nature du composé responsable de l'apparition d'une certaine viscosité dans les jus de betterave sucrés (Scheibler, 1874), le comportement que Pasteur en 1861 (Pasteur, 1861) l'avait déjà attribué à l'action des microorganismes. Plus tard, en 1878, Van Tieghem a isolé le microorganisme responsable de la gélification et l'a nommé *Betacoccus mesenteroides*. Hestrin, Averini-Shapiro et Aschner (1943) ont nommé l'enzyme extracellulaire correspondant à la production du dextrane comme dextrane-saccharase (Vettori et al., 2012).

Le dextrane est un HoPS d'une masse moléculaire élevée, son hydrolyse chimique contrôlée permet la production de fractions ayant une masse moléculaire moyenne de 70 kDa d'une application industrielle importante (Vettori et al., 2012). Ces produits sont utilisés pour des applications cliniques présente au minimum 50% des liaisons α -(1,6) dans sa chaîne principale

et différents types de ramifications, principalement α -(1,3), mais aussi α -(1,2) ou α -(1,4) en fonction de la souche productrice (Monsan et al., 2001) (Tableau 1). Ce biopolymère est principalement produit par plusieurs espèces du genre *Leuconostoc* (Misaki et al., 1980), *Lactobacillus* (Nácher-Vázquez et al., 2015), *Streptococcus* (Germaine et Schachtele, 1976) et *Weissella* (Katina et al., 2009). Le dextrane synthétisé par *L. mesenteroides* NRRL B-512F a été l'un des premiers biopolymères fabriqués industriellement par diverses applications en biotechnologie et en médecine contenant 95% des liaisons α -(1,6) et 5% des ramifications α -(1,3) (Korakli, 2006).

7-2- Dextrane-saccharase

Les dextrane-saccharases (EC 2.4.1.5) (DSR) sont GS qui appartiennent à la famille GH70, ces glycosyltransférases catalysent le transfert des résidus D-glucosyl de saccharose en dextrane en libérant le fructose (Naessens et al., 2005), dans la réaction chimique suivante :



Ces enzymes peuvent être sécrétées dans le milieu ou restent attachées à la surface cellulaire. Différentes espèces des genres *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont capables de produire différents types de GS qui synthétisent des glucanes avec différentes structures et propriétés (Vettori et al., 2012). En outre, l'expression du gène codant pour l'enzyme est constitutive, dans le cas des espèces de *Streptococcus* et inductible par le saccharose pour *L. mesenteroides* (Neely et Nott, 1962), bien que des mutants de cet espèce ont été isolés dont la synthèse de l'enzyme est constitutive (Kim et Robyt, 1994). Dans le cas de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, il a été démontré la synthèse de cet enzyme à des niveaux bas, lorsque l'espèce citée est cultivée en présence de glucose ou de fructose dans le milieu (Quirasco et al., 1999). Certaines fonctionnalités ont été déterminées pour la dextrane-saccharase: (i) un poids moléculaire moyen de 170 kDa; (ii) un point isoélectrique de 4,1; (iii) une constante Michaelis-Mendel (Km) pour le saccharose est de 12-16 mM; (iv) un pH optimal compris entre 5 et 5,5; (v) la température optimale entre 20 °C et 30 °C (Leemhuis et al., 2013) et (vi) une exigence de calcium pour l'activité enzymatique (Robyt et Walseth, 1979).

Les dextrans ne peuvent pas être synthétisés par les dextrane-saccharases en utilisant un autre substrat naturel que le saccharose. D'autres carbohydrates tels que le glucose, le fructose, le mannose et le lactose, conduisent à la croissance microbienne, mais pas la production de la dextrane-saccharase chez les espèces de *Leuconostoc* (Robyt, 1985). L'énergie entre la liaison joignant les molécules de glucose et de fructose (16,7 à 20,9 kJ mol⁻¹) est utilisée pour la

synthèse de dextrane sans aucune nécessité à des molécules d'ATP ou d'autres co-facteurs. En présence d'un accepteur efficace, tel que le maltose et isomaltose, les dextrane-saccharases synthétisent les oligosaccharides (Ruiz-Matute et al., 2011). Par exemple, *L. mesenteroides* NRRL B-1299 en présence du maltose synthèse des oligosaccharides liés avec des liaisons α -(1,2), qui sont très résistantes à l'attaque par les enzymes digestives et ils ont aussi utilisés comme des prébiotiques (Remaud-Simeon et al., 2000). Cependant, en présence de fructose, il synthétise un disaccharide inhabituel, le leucrose. En plus, les dextrane-saccharases ont été utilisées comme des enzymes immobilisés pour la production des isomaltooligosaccharides (Monsan et al., 2001).

Lorsque des taux élevés de saccharose sont utilisés pour la production de dextrane, la viscosité de la culture affecte la croissance cellulaire et, par conséquent, la production d'enzymes et la séparation des cellules bactériennes sont entravées. Les études ont montré que le saccharose à 2% (p/v) était la concentration adéquate pour une production optimale de la dextrane-saccharase (Vettori et al., 2012). La viscosité des milieux rend la purification de l'enzyme plus difficile. Divers procédés tels que l'ultrafiltration, la précipitation avec du sel ou avec polyéthylène-glycol, la chromatographie et la séparation par phases et la combinaison de ces méthodes ont été utilisées pour purifier ces enzymes. Comme une alternative, les mutants constitutifs qui synthétisent l'enzyme en absence de saccharose sont utilisés en évitant ainsi la formation de dextrane (Mizutani et al., 1994).

7-3- Production du dextrane

Les dextrans fabriqués industriellement proviennent principalement des souches de espèces *L. mesenteroides* à l'aide des paramètres optimisés comme suit : (i) un milieu de culture contenant du une concentration adéquate de saccharose, une source d'azote (par exemple peptone), du phosphate, des oligo-minéraux et des facteurs de croissance ; (ii) à pH 6,7 à 7,2 ; (iii) à une température de 25 °C à 30 °C, et (iv) pendant une durée de la fermentation entre 24 h et 48 h (Naessens et al., 2005).

Dans le procédé classique d'obtention du dextrane, après la fermentation, les cellules sont éliminées par centrifugation et le dextrane est récupéré par précipitation avec l'éthanol en éliminant ainsi les cellules et l'enzyme. Alternativement, des enzymes immobilisés peuvent être employées, comme cité précédemment, ce qui permet leur réutilisation et facilite le contrôle des conditions de production, étant la production la plus reproductible et propre. Toutefois, la stratégie d'immobilisation est le plus souvent utilisé pour la synthèse d'oligosaccharides que pour le dextrane (Tanriseven et Doğan, 2002).

7-4- Applications du dextrane

La première utilisation industrielle des dextrans bactériens était comme substitut du plasma sanguin. Les dextrans d'une masse moléculaire très élevée ou avec une faible proportion des liaisons α -(1,6) sont plus susceptibles de provoquer des réactions allergiques (Naessens et al., 2005), cependant, ils ne peuvent donc pas être utilisés. Par conséquent, les dextrans de taille comprise entre 40.000 et 100.000 Da sont utilisés, tels que ceux produits par *L. mesenteroides* NRRL B-512F avec des poids moléculaires de 70.000, 60.000 et 40.000 Da (Monsan et al., 2001). Ce polymère incroyable a trouvé des applications dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et chimique et clinique. Dans le domaine médical, le dextrane est utilisé pour son effet antithrombotique, son activité anticoagulante (le sulfate de dextrane) et antiviral, son usage dans les fluides intraveineux, son rôle dans la cryopréservation pour stocker les organes pour la transplantation et comme porteurs dans des vaccins. En plus, le fer-dextrane est utilisé pour lutter contre l'anémie ferriprive (Mauray et al., 1998).

En industrie chimique et pharmaceutique, le dextrane joue un rôle d'un tamis moléculaire. Il a été utilisé la première fois en 1959 par Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suède), révolutionnant la purification et la séparation des macromolécules (protéines, acides nucléiques et polysaccharides). Commercialement ils sont connus comme Sephadex (SEparation PHarmacia DEXtran). En industrie photographique, les fractions de dextrane hautement purifiées sont largement utilisées comme un amplificateur des techniques et la qualité d'imagerie. Dans le domaine de production de cosmétique, le dextrane est aussi impliqué dans la production des crèmes et des produits de soins de la peau comme un agent hydratant et épaississant (Bhavani et Nisha, 2010).

En industrie alimentaire, l'incorporation de dextrane dans les produits de boulangerie améliore la texture et le volume de pain. Les dextrans ont également été utilisés comme additifs dans des plusieurs produits tels que les bonbons et des glaces (Vettori et al., 2012). Il a été utilisé comme stabilisant pour la confiserie où sa présence empêche la cristallisation, améliore la rétention d'humidité, augmente la viscosité et maintient la saveur. Son utilisation est également proposée dans les boissons gazeuses, les boissons à base du lait et les compositions de glaçage. Comme substance comestible non toxique, le dextrane est considéré comme ayant de nombreux avantages par rapport aux autres stabilisateurs de crème glacée. Des essais effectués sur des mélanges de crème glacée contenant de 2 % à 4 % de dextrane ont indiqué qu'ils conféraient des propriétés bénéfiques à la viscosité. Les propriétés favorables du dextrane pour la

stabilisation des aliments lyophilisés ou congelés comme les poissons, la viande, les légumes et le fromage. La protection des surfaces avec un film de dextrane pourrait protéger les aliments de l'oxydation et d'autres changements chimiques et aussi aider à préserver la texture et la saveur (Bhavani et Nisha, 2010).

Matériel et méthodes

1- Provenance des échantillons

1-1- Laits

Les échantillons du lait ont été prélevés dans des conditions d'hygiène parfaites dans des flacons de 250 mL stériles. Ces derniers ont été transportés immédiatement au laboratoire pour être analysés. Dans le cas des zones lointaines, les échantillons ont été conservés à 4 °C lors de leur transport au laboratoire.

Echantillons	Provenance	Date de prélèvement
Lait de chamelle	Abadla à Bechar –Algérie	Janvier 2011
Lait de chèvre	Tafraoui à Oran – Algérie	Avril 2011
Lait de Brebis	Sig à Mascara – Algérie	Avril 2011

1-2- Fromage Bleu

Le fromage bleu utilisé pour l'échantillonnage était le fromage danois « ROSENBORG » de 100 g fabriqué en Mars 2011, commercialisé à Oran.

1-3- Ensilage

Les échantillons des fourrages utilisés, préparés à base de l'avoine et l'orge (6 mois), sont prélevés à partir d'une ferme au niveau de la région de Sig, Wilaya de Mascara, en Mars 2012.

1-4- Miel

Le miel naturel utilisé pour l'échantillonnage est venu des ruches d'abeilles installées à Chorfa, commune de la wilaya de Mascara. Ce miel est produit à partir du nectar des fleurs, ce dernier est butiné, transformé et emmagasiné jusqu'au mûrissage dans les rayons des ruches. Les échantillons du miel ont été prélevés dans des tubes stériles directement à partir des rayons, en Juin 2011.

2- Bactéries utilisées

Les bactéries tests de référence utilisées pour les interactions microbiennes étaient : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922 qui appartiennent à la collection du laboratoire de microbiologie appliquée LMA d'Oran.

Les bactéries lactiques utilisées dans ce présent travail étaient : *L. mesenteroides* RTF10 (Notararigo et al, 2013) et *Lb. sakei* MN1 CECT 8329 (Nácher-Vázquez et al, 2015), isolées

des produits carnés espagnols. Autres souches ont été utilisées *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CRL 264 (Sesma et al., 1990) et *W. paramesenteroides* J1 (Martin et al., 2005) isolées des fromage argentins.

3- Isolement et identification des isolats

3-1- Préparation des échantillons

1 mL de l'échantillon (1 g pour le fromage et l'ensilage) est pipeté aseptiquement dans 9 mL d'eau physiologique et des dilutions décimales sont réalisées (10^{-1} à 10^{-8}). Seules les dilutions 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} sontensemencées en profondeur sur boites (1 mL). Le milieu MSE (Mayeux et al., 1962) additionné de la vancomycine (30 μ g par mL) (MSEV) (Mathot et al., 1994) sont ensuite coulés afin d'inhiber la croissance des autres bactéries et de détecter les souches productrices des EPS. Les boites sont incubées à 30 °C pendant 48 h.

Tableau 2. Codes des bactéries isolées à partir de six écosystèmes différents

Echantillons	Lait de chamelle	Lait de chèvre	Lait de brebis	Fromage bleu	Ensilage	Miel
Code de la souche	CM5	GM2	SM29	F9	E14	M67
	CM6	GM4	SM30	F10		
	CM9	GM5	SM33			
	CM11	GM6	SM34			
	CM30	GM7	SM35			
	CM55	GM8	SM73			
	CM57	GM9	SM74			
	CM70	GM10				
	CM72					

3-2- Identification phénotypique

a- Caractérisation macroscopique et microscopique

Selon l'apparence macroscopique (forme, taille, pigmentation, contour, viscosité), des colonies typiques ont été isolées de chaque échantillon à partir des boites contenant entre 25 et 250 colonies (milieu MSEV) et repiquées dans le bouillon MRS (de Man et al., 1960) et incubées à 30 °C. Après incubation, les colonies ont été réensemencées dans du MRS solide.

Les colonies subissent deux tests comme une pré-identification, le premier test était la coloration de Gram (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1975) qui nécessite de déposer quelques gouttes de violet de gentiane sur un frottis fixé pendant 1 min, après rinçage, le lugol est déposé

pendant 30 sec, la préparation est décolorée à l'alcool 90% et rincé à l'eau distillée. Comme une dernière étape, quelques gouttes de la fuchsine sont versées sur la lame en la laissant agir 1 min. La lame est ensuite lavée à l'eau distillée. Après séchage, la lame est passée à l'observation microscopique. Le deuxième test était la recherche de l'enzyme catalase (Marchal et al., 1991) qui nécessite le dépôt de l'eau oxygénée à 10 volumes sur la colonie bactérienne et un dégagement gazeux traduit l'activité de la catalase.

Les photos des observations microscopiques ont été prises à partir d'une suspension bactérienne des souches d'une absorbance à 600 nm (A_{600nm}) de 1 en utilisant le microscope optique Leica DM 1000 couplée à une caméra Leica DFC 3000G.

Une observation, à l'aide d'un microscope électronique de transmission JEOL 1230 a été aussi réalisée en utilisant la coloration au rouge de ruthénium selon la méthode décrite par Akin et Rigsby (1990).

Cette méthode a été adaptée pour des colonies cultivées sur des plaques MRSG, en collaboration avec le service de la microscopie électronique, Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, Espagne). Pour cela, la plaque contenant les colonies séparées, elle a été couverte par une deuxième couche d'une solution d'agarose à 2%. Après solidification, une seule colonie est découpée, avec un scalpel, pour une analyse ultérieure. Les cellules présentes dans les échantillons fraîchement préparés ont été fixées avec 2,5% de glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M (pH 7,4) et des sections ont été coupées. Les cellules incluses dans ces sections ont été post-fixées avec 1,5% OsO_4 dans un tampon de cacodylate de sodium 0,1 M (pH 7,4) contenant 0,075% de rouge de ruthénium, lavées trois fois dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M (pH 7,4), déshydratés par une série de solutions aqueuses d'éthanol (30%, 50%, 70%, 95% et 100% d'éthanol, pendant 5 min chacune) et fixées dans une résine blanche. Les sections finales ont été découpées en 60 nm avec un couteau de diamant de Diatome, en utilisant un ultramicrotome Leica Ultracut UC6 (Leica Microsystems, Mannheim, Allemagne) et examinées avec un microscope électronique à transmission après coloration avec de l'acétate d'uranyle.

b- Identification des isolats

Parmi plus de 100 isolats, vingt-huit ont été retenus pour suivre l'identification phénotypique et génotypique et l'étude de quelques caractères technologiques.

▪ Production de gaz à partir du glucose

Un tube contenant le bouillon MRS additionné de 2% de glucose (MRSG) et une cloche de Durham, est inoculé avec la souche à étudier pour mettre en évidence la production du CO_2 et

de savoir ainsi le type fermentaire, Après une incubation de 24 h à 30 °C, la présence du gaz dans la cloche indique un métabolisme hétérofermentaire (Hayward, 1957).

- **Hydrolyse de l'arginine**

La recherche de l'arginine dihydrolase est étudiée sur le milieu M16 BCP. En plus de l'indicateur de pH le pourpre de bromocrésol (0,05 mg par mL), ce milieu contient deux principaux substrats : le lactose (2 mg par mL) et l'arginine (4 mg par mL). Les bactéries lactiques utilisent le lactose en acidifiant le milieu, les colonies donnant ainsi une coloration jaunâtre. Les bactéries lactiques qui sont capables d'utiliser l'arginine réalcalinisent le milieu, leurs colonies apparaissent blanchâtres. La couleur de l'indicateur de pH demeure inchangée (Thomas, 1973).

- **Croissance à différentes températures**

La croissance bactérienne est évaluée par un trouble en milieu MRS après 24 h à 48 h d'incubation à 4 °C, 15 °C, 37 °C et 45 °C (Guiraud, 2003).

- **Tolérance à la salinité et à l'acidité**

La croissance des souches a été testée à différents pH (4,8 et 6,5) et à différentes concentrations de NaCl (3% et 6,5%). La croissance se manifeste par un trouble en milieu MRS liquide (Guiraud, 2003).

- **Utilisation des carbohydrates**

La fermentation des carbohydrates a été menée sur milieu MRS sans extrait de viande, sans sucre et additionné au pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH (MRSBCP-EV). La source de carbone est représentée par l'un des sucres suivant: arabinose, glucose, fructose, galactose, lactose, maltose, mannitol, esculine, sorbitol, rhamnose, saccharose, et xylose (Badis et al., 2004). Les solutions sucres sont préparées à 3% et stérilisées au bain marie (110 °C/10 min). 1 mL de la solution sucrée est additionné à 10 mL de MRSBCP-EV. Dans des tubes à hémolyse (galerie classique), 1 mL du milieu plus sucre est ensuite additionné de 0,1 mL de la solution bactérienne (le culot d'une culture jeune de la souche pour former la suspension finale). 0,5 mL d'huile de paraffine a été ajouté pour créer les conditions d'anaérobiose. L'utilisation d'une plaque d'Elisa a été utilisée comme une méthode complémentaire miniaturisée pour confirmer les résultats obtenus. Les puits de chaque colonie contiendront une source de carbone qui sera utilisée par différentes souches. La lecture des résultats se fait après 24 et 48 h d'incubation à 30 °C (Björkroth et Holzappel, 2006).

Les souches sélectionnées ont subi aussi une identification par les galeries API® 50 CHL (*bioMérieux*, France) en étudiant le métabolisme des 49 sucres de la galerie. La bactérie à tester a été inoculée dans chaque tube de la galerie contenant un substrat différent sur lequel elle allait réagir. Pendant l'incubation, le catabolisme des glucides conduit à la production d'acides organiques qui provoquent le virage de l'indicateur de pH ce qui donne une coloration différente à chaque cupule (le même principe d'une galerie classique) (Aplevicz et al., 2014). Le profil biochimique obtenu a été analysé à l'aide d'un logiciel d'identification *apiweb*™.

▪ **Production des EPS**

La stabilité de la production des EPS à partir du saccharose, après isolement et purification, est mise en évidence sur le même milieu solide MSE sans l'ajout d'antibiotique. Les souches productrices sont caractérisées par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes. Ce test est aussi considéré comme clé d'indentification permettant la différenciation entre les *leuconostocs* productrices et non productrice des EPS.

▪ **Production d'acétoïne**

La production d'acétoïne est testée sur milieu Clark et Lubs (Samelis et al., 1994) qui est inoculé par les souches à tester et incubé à 30 °C. Après la croissance et dans un tube à hémolyse, 1 mL de cette culture est mélangé avec 0,5 mL de réactif α -naphthol à 6% (p/v) (VP1) et 0,5 mL d'une solution de soude (NaOH) à 16% (p/v) (VP2) pour assurer la réaction de Voges-Proskauer dite réaction de VP, le tube est soigneusement agité à l'air libre. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau rose à la surface du milieu.

c- Conservation des souches identifiées

Deux types de conservation des souches pures sont utilisés. Une à courte durée et l'autre à longue durée. La conservation à court terme est effectuée sur milieu solide MRS incliné. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4 °C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines (Badis et al., 2004). Tandis que, dans la conservation à longue durée, les cultures sont conservées en suspension dense et en tubes eppendorfs contenant 70% de lait écrémé (enrichi par 0,05% d'extrait de levure) ou le bouillon MRS et 30% de glycérol, tenus à -80 °C (Marino et al., 2003).

3-3- Identification géotypique

a- Identification de l'espèce par le séquençage de ADNr 16S

▪ Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique (ADN_G) a été isolé en appliquant le protocole suivant : on a fait croître la bactérie dans le milieu MRS liquide à 30 °C jusqu'à l'obtention d'une A_{600nm} de 2,0. On a centrifugé 1 mL de la culture bactérienne à 15.700 x g à 4 °C pendant 10 min suivie d'un lavage du culot par 0,5 mL de tampon phosphate PBS. La centrifugation a été répétée et le culot a été resuspendu dans 0,1 mL d'une solution qui contient 25% de saccharose, 50 mM de tampon Tris (pH 8.0), 0,1 M de NaCl, 30 mg par mL du lysozyme, 240 U par mL de mutanolisine et 80 µg par mL de ARNase A. Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 15 min pour favoriser la lyse cellulaire. Après, le mélange a été complétée par 10 µL de SDS à 10% et mis en incubation pendant 2 min. le tout a été passé, ensuite, trois fois par une seringue avec une aiguille de 25 GA (0.5 x 16 mm). Les extraits ont été déprotéinisés en ajoutant 1:1 (v/v) phénol:chloroforme-alcool isoamélique (24-1) à température ambiante (t.a) pendant 5 min. Le mélange a été centrifugé à 15.700 x g à t.a pendant 10 min. ces deux dernières étapes ont été répétées trois fois jusqu'à la disparition des protéines en utilisant la phase aqueuse supérieure qui contient l'ADN. L'ADN a été précipité avec l'addition de 1 mL d'éthanol absolu et 40 µL d'acétate de sodium 3M (pH 7.0) durant 20 h à -20 °C et centrifugé à 11.269 x g à -10 °C durant 45 min. Après élimination du surnageant, 1 mL d'éthanol à 70% a été ajouté à l'ADN_G qui a été précipité et centrifugé à 11.269 x g à -10 °C durant 30 min. L'ADN a été finalement mis en suspension dans 100 µL de du tampon 10 mM Tris (pH 8.0). La pureté de l'ADN_G a été effectuée par la mesure du spectre d'absorption dans l'intervalle A_{300nm}-A_{200nm} et le rapport A_{260nm}/A_{280nm} par le NanoDrop (Thermo Scientific spectrophotomètre NanoDrop 2000). La concentration de l'ADN_G a été quantifiée par une méthode fluorométrique un utilisant Qubit® dsDNA BR Assay Kit et le fluoromètre Qubit® 1.0 qui se caractérise par une sensibilité, une simplicité, une haute technologie et surtout par la spécificité qui est dépourvue chez la méthode de détection directe par spectrométrie d'absorption (Domingues et al., 2013).

▪ Electrophorèse sur gel d'agarose

La technique d'électrophorèse sur gel d'agarose a été utilisée pour séparer les acides nucléiques, chargés négativement, sous l'effet d'un champ électrique continu. Des aliquotes d'ADN, préalablement mélangées au tampon de charge SBE (saccharose à 10%, bleu de bromophénol à 0,025% et EDTA à 0,85 mM), ont été soumis à une électrophorèse dans des gels d'agarose

horizontaux à une concentration de 0,8% en utilisant un tampon 0,5X TAE (Tris base 20 mM à pH 8.3, acétate à 10 mM et EDTA à 0,5 mM). L'électrophorèse a été réalisée à une tension constante de 100 V dans un tampon 0,5X TAE à l'aide d'un générateur Power Universal® (Biorad). Les dimensions des gels et la durée d'électrophorèse varient en fonction des caractéristiques de l'ADN à analyser. L'ADN a été visualisé par coloration avec GelRed 1X (Biotium Inc., Hayward, CA, États-Unis) et les images ont été capturées et numérisées en utilisant le système de documentation de gel GelDoc 200 Bio-Rad (West Berkeley, Californie, États-Unis) composé de transilluminateur la lumière ultraviolette (UV) d'une courte longueur d'onde (254 nm) et un appareil photo numérique. Ces images ont été analysées avec Quantity One 4.5.2 logiciel Bio-Rad. Le marqueur de taille Smart Ladder MW-1700-10 (Eurogentec, Osaka, Japon) a été utilisée pour déterminer le poids moléculaire (Huang et al., 2010).

▪ Amplification et séquençage

L'amplification et le séquençage du gène codant pour ARNr 16S a été assuré par le service Secugen (Centro de Investigaciones Biológicas, CIB, Madrid, Espagne). La détection et l'amplification du gène ont été réalisées par PCR en utilisant les amorces suivantes : 16SF (5'-GAGTTTGATCATGGCTCAGA-3') et 16SR (5'-GACGGGCGGTGTGTAC-3'). Ces séquences oligonucléotidiques ont été dessinées par le service en se basant sur le gène ARNr 16S de l'espèce *E. coli* KO11FL.

b- Identification des sous-espèces

Pour compléter l'identification et différencier entre les sous-espèces de l'espèce *L. mesenteroides*, des amorces spécifiques de la sous-espèce *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ont été utilisées (LmmF: 5'-CCGTTACCCCTAAATT-3', LmmR: 5'-GACCAAATACAATAGGTTGCG-3') (Sigma-Aldrich). L'amplification par la PCR a été réalisée dans un milieu réactionnel en utilisant environ 50 ng d'ADN_G comme matrice, 1 µL des amorces oligonucléotidiques (sens et anti-sens) citées précédemment à 10 µM, 4 µL du tampon Phusion HF à 5x, 0,4 µL de dNTPs à 10 mM et 0,2 µL de la polymérase Phusion High Fidelity DNA, dans un volume total de 20 µL. La réaction de PCR a été lancée suivant le cycle de température [30 sec à 98 °C puis 35 cycles (10 sec à 98 °C, 30 sec à 67 °C, 30 sec à 72 °C), puis 10 min à 72 °C], à l'aide d'un thermocycleur TC-512 (Techne, Stone, Reino Unido).

Un contrôle négatif en absence d'ADN a été réalisé pour chacune des réactions PCR suivant le cycle de température décrit précédemment.

Des aliquotes de produits d'amplification ont été analysées sur gel d'agarose à 0.8% pour vérifier la présence d'amplicon et déterminer sa taille. Cette dernière a été calculée en

comparant l'intensité des bandes d'ADN avec les fragments ayant une taille similaire et une concentration connue de l'ADN marqueur Smart Ladder (Moschetti et al., 2000).

4- Activité protéolytique

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est mise en évidence sur milieu PCA additionné à 1%, 3% et 5% (v/v) de lait écrémé (Moslehishad et al., 2013). Les bactéries à tester, issues des cultures jeunes, ont été ensemencées par touche à la surface à l'aide d'un inoculateur multipoints. Après séchage, les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 48 h, l'activité protéolytique de ces bactéries se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Sonar et Halami, 2014).

5- Activité lipolytique

L'activité lipolytique a été recherchée sur milieu MRS tamponné à pH 7,0 et additionné de 1%, 3% ou 5% de tween 20 (source lipidique artificielle) ou d'huile d'olive (source lipidique naturelle) (Guiraud et Galzy, 1980). Le milieu est opacifié par le carbonate de calcium CaCO₃ à raison de 0,5% afin de bien visualiser l'éventuelle présence de cette activité. Les bactéries à tester, issues d'une culture jeune, ont été ensemencées par touches à la surface de ces milieux de cultures à l'aide d'un inoculateur multipoints. Après incubation à 30 °C pendant 48 h, l'activité lipolytique de ces bactéries se manifeste par une clarification des touches (Jini et al., 2011).

6- Utilisation du citrate

L'utilisation du citrate a été étudiée sur milieu Kempler et Mc Kay (KMK) (Kempler et Mc Kay, 1980). Ce milieu contient une solution de ferricyanure de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le potassium ferricyanide. Les colonies qui métabolisent le citrate lancent la réaction entre ces ions, il en résulte la formation de colonies bleues ou ayant un centre bleu (après 18 h-72 h d'incubation). Les colonies incapables de fermenter le citrate restent blanches (Drici et al., 2010).

Pour étudier un peu plus ce caractère technologique important, les souches CM9, CM70 ainsi que d'autres souches, utilisées comme contrôles positifs : *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CRL264 et *W. paramesenteroides* J1, pour passer à la détection de gène partiel *citP*, codant pour la protéine responsable du transport du citrate à l'intérieur de la cellule.

6-1- Extraction d'ADN plasmidique (ADN_P)

L'ADN plasmidique a été isolé selon le protocole proposé par O'Sullivan et Klaenhammer, (1993) et qui est le suivant : les bactéries ont été cultivées dans le milieu MRS liquide à 30 °C jusqu'à l'obtention d'une $A_{600nm} = 2.0$, centrifugées à 15700 x g à 4 °C pendant 10 min suivie d'un lavage du culot avec du tampon phosphate PBS. Après une autre centrifugation, le culot a été suspendu dans un volume final de 200 µL d'une solution qui contient 25% de saccharose, 30 mg par mL de lysozyme et 40 µg par mL de ARNase A. Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 15 min pour favoriser la lyse cellulaire. Ce mélange a été additionné de 400 µL de SDS à 3% et 0,2 N NaOH et incubé durant 7 min à température ambiante. 300 µL de 3M d'acétate de sodium (pH 4,8) ont été ajoutés ultérieurement, en mélangeant le tout soigneusement. Cette étape a été suivie par une centrifugation à 15700 x g à 4 °C pendant 15 min. La précipitation d'ADN présent dans le surnageant a été réalisée avec l'ajout de 650 µL d'isopropanol en mélangeant soigneusement, suivie d'une centrifugation dans les mêmes conditions précédentes. Le culot a été ensuite resuspendu dans 320 µL d'eau distillée stérile et additionné de 200 µL d'acétate d'ammonium à 7,5 M contenant 0,5 mg/mL de bromure d'éthidium et 350 µL du 1:1 (v/v) phénol:chloroforme-alcool isoamérique (24-1). Le mélange a été centrifugé à 15.700 x g à t.a pendant 10 min. La phénolisation a été répétée jusqu'à la disparition des protéines en utilisant la phase aqueuse supérieure qui contient l'ADN. La précipitation finale d'ADN a été faite avec 1 mL d'éthanol absolu durant 20 h à -20 °C. Cette préparation a été centrifugée à 11269 x g à -10 °C durant 45 min, lavé avec 1 mL d'éthanol à 70%, centrifugé à 11269 x g à -10 °C durant 30 min. L'ADN_P a été resuspendu dans 100 µL de 10 mM du tampon Tris (pH 8,0).

La pureté de l'ADN a été vérifiée en mesurant A_{260nm}/A_{280nm} par le NanoDrop. La concentration de l'ADN a été quantifiée en utilisant Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit et le fluoromètre Qubit[®] 1.0 (Thermo Fisher Scientific, USA).

6-2- Détection du gène *citP* partiel

Pour détecter la présence de du gène codant pour l'enzyme clé du métabolisme du citrate chez les BL, la citrate perméase CitP, une partie conservée a été détectée par PCR en utilisant les amorces suivantes : CitPF (5'-GAAATTGGGAAGCTCGATCG-3') et CitPR (5'-GTTGATGCCAGGGAACACCT-3') (IDT, Iowa, États-Unis).

L'amplification par PCR a été réalisée dans un milieu réactionnel en utilisant environ 10 ng d'ADN_P comme matrice, 1 µL des amorces oligonucléotidiques (sens et anti-sens) citées

précédemment à 10 µM, 4 µL du tampon Phusion GC à 5X, 0,4 µL de dNTPs à 10 mM et 0,2 µL de la polymérase Phusion High Fidelity DNA, dans un volume total de 20 µL. La réaction de PCR a été lancée suivant le cycle de température [30 sec à 98 °C puis 35 cycles (10 sec à 98 °C, 30 sec à 66 °C, 30 sec à 72 °C), puis 10 min à 72 °C], à l'aide d'un thermocycleur TC-512 (Techne, Stone, Reino Unido).

Un contrôle négatif en absence d'ADN a été réalisé pour chacune des réactions PCR suivant le cycle de température décrit précédemment. Des aliquotes de produits d'amplification ont été analysées sur gel d'agarose à 0.8% pour vérifier la présence d'amplicon et déterminer sa taille. Cette dernière a été calculée en comparant l'intensité des bandes d'ADN avec les fragments ayant une taille similaire et une concentration connue de l'ADN marqueur Smart Ladder (Kihal et al., 1996).

7- Cinétique d'acidification en milieu lait écrémé

Six souches (CM9, GM2, SM34, F9, E14 et M67) ont été sélectionnées à partir de six écosystèmes choisis afin d'étudier la cinétique d'acidification. Elles ont étéensemencées d'abord sur MRS liquide et incubée à 30°C pendant 18 h, ensuite 0,1 ml de cette culture jeune a été inoculé dans un tube contenant 10 mL de lait écrémé incubé à 30 °C pendant 18 h. Cette préculture a été additionnée à raison de 1% à une fiole contenant 100 mL de lait écrémé additionné de 0.3% d'extrait de levure et le tout a été ensuite réparti en 10 tubes de 10 mL chacun. Pour étudier la cinétique d'acidification, chaque deux heures, durant 16 h, un tube a été utilisé pour suivre le pH et l'évolution de l'acidité, suivi par le point de 24 h (Kihal et al., 2007).

7-1- Mesure du pH

L'acidité développée dans le lait est suivie aussi par une mesure de pH à l'aide d'un pH mètre (Crison basic 20+, Espagne)

7-2- Mesure de l'acidité titrable

Le dosage de l'acidité au cours de la croissance des souches dans le lait est effectué selon la méthode décrite par Accolas et al. (1977) en utilisant : un statif avec noix et pince, une solution de NaOH N/9, une burette de 25 mL, une pipette jaugée de 10 mL et une solution de phénolphthaléine à 1% dans l'éthanol. On remplit la burette de la solution de NaOH N/9, on la fixe au statif et on règle le niveau du liquide à zéro. Le tube incubé contenant la culture en lait, est versé dans un bêcher dans lequel sont ajoutées 5 gouttes de phénolphthaléine. Le titrage

s'effectue sous agitation. On considère que le virage est atteint, que la couleur blanche du lait vire au rose pâle et persiste pendant une dizaine de secondes.

L'étude de la cinétique est complétée par le calcul des vitesses spécifiques comme celles d'évolution de pH et d'acidité. Ceci est accompagné avec la détermination de la valeur finale de chaque paramètre. Ces vitesses sont estimées par régression linéaire dans la phase exponentielle et le calcul de la pente représente la vitesse appropriée. La capacité des souches à coaguler le lait se manifeste par l'apparition d'un coagulum avec la présence des fissures ou des vides.

8- Profil protéique

Pour comparer le profil protéique des différents souches, isolés à partir de différents écosystèmes (lait de chamelle, lait de chèvre, lait de brebis, fromage bleu, ensilage et miel), quatorze souches ont été choisies pour l'extraction des protéines totales selon la méthode modifiée de Grimm et al. (2014).

8-1- Extraction des protéines

Pour l'extraction des protéines, Les cultures bactériennes ont été cultivées dans le milieu MRS, avec une pré-culture gardée au froid, et incubé à 30 °C jusqu'à une A_{600nm} de 1.0. Les bactéries ont été sédimentées par centrifugation à 11269 x g durant 10 min à t.a, le culot a remis en suspension dans le même volume initial. Cette suspension a été inoculée autre fois dans le milieu MRS et incubé jusqu'à une $A_{600nm} = 1.0$. La culture été centrifugé à 11269 x g durant 10 min à 4 °C, le culot été lavé avec le tampon PBS froid (pH 7.4) et congelé à -70 °C. Pour préparer les extraits protéiques, le culot été décongelé à 4 °C et remis en suspension dans 291 μ L TE (10 mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA) et 9 μ L du sodium dodécyl sulfate (SDS) à 10%. Les cellules été rompues par le Ribolyser (Hybaid) en mettant la suspension dans des cryotubes avec des billes en verre pré-incubés à 0 °C et en appliquant deux cycles successives durant 45 sec à vitesse 6. La suspension a été centrifugé à 11269 x g durant 20 min à 4 °C pour séparer les billes du lysat. La suspension supérieure contenant les protéines a été récupérée et gardée à -70 °C. La concentration des protéines a été quantifiée par la suite en utilisant le Qubit[®] Protein Assay Kit et le fluoromètre Qubit[®] 1.0.

8-2- Electrophorèse sur gel de polyacrélamide en présence de SDS

L'électrophorèse a été réalisée selon Laemmli (1970) afin d'estimer le poids moléculaire des bandes de protéine. La séparation des molécules se fait en milieu basique en présence d'un détergent, le SDS, qui masque la charge des protéines par sa propre charge négative et permet donc de faire migrer les protéines selon leurs poids moléculaires et leurs conformations uniquement.

Deux mini-gels ont été utilisés à deux concentrations différentes de d'acrylamide-bisacrylamide ont été utilisés. Le premier gel (inférieur) est le gel de séparation à 12% qui permet la séparation des protéines tandis que le deuxième gel (supérieur) est le gel de concentration à 5% dont son rôle est de concentrer les protéines en les permettant une entrée homogène des échantillons dans le gel de séparation. Des pistes individuelles sont réalisées par l'utilisation d'un "peigne" qui sépare le gel en portions égales destinées à la migration de chaque échantillon. La composition des deux gels, pour un volume final de 6 mL, est indiquée dans le tableau 2.

Après polymérisation, les échantillons des protéines, déjà dénaturés à 100 °C pendant 5 min, sont mélangés avec le tampon de charge SLB 5X (1,5 mL de 1M Tris pH 6,8, 0,6 g de SDS, 1.5 mL β -mercaptoethanol, 3 mL de glycérol stérile et 30 mg bleu de bromophénol), qui déjà porté à ébullition à 100 °C, pour une concentration finale de 1X. Les échantillons sont déposés ensuite à raison de 10 μ g de protéines par puit.

Le marqueur de taille utilisé est le SeeBlue (Standard Plus 2 pré-coloré, Invitrogen) contenant 10 protéines avec un poids moléculaire de 250-4 kDa (myosine 250 kDa, phosphorylase 148 kDa, albumine de sérum bovin 98 kDa, déshydrogénase glutamique 64 kDa, déshydrogénase alcool 50 kDa, anhydrase carbonique 36 kDa, myoglobine rouge 22 kDa, lysozyme 16 kDa, aprotinine 6 kDa, insuline chaîne B 4 kDa).

Tableau 3. Composition des gels de séparation et de concentration

Produits	Gel de séparation 12%	Gel de concentration 5%
H ₂ O MilliQ	2 mL	3,4 mL
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	1,5 mL	1,5 mL
SDS 10%	60 μ L	60 μ L
Acrylamide : Bisacrylamide (30% : 0.8%)	2,4 mL	1 mL
Persulfate d'ammonium 10%	30 μ L	30 μ L
Temed	3,5 μ L	3.5 μ L

Le tampon de migration est constitué de Tris 3 g par L, glycine 14.4 g par L et SDS 1 g par L avec un pH 8,3. L'électrophorèse est effectuée à 150 V.

Après migration, le gel de polyacrylamide, en premier lieu, est coloré au bleu de Coomassie (R250) à 0.25%, ensuite, le gel est soumis à une décoloration rapide pendant 1 h à t.a, suivie par une décoloration lente pendant 20 h à t.a jusqu'à ce que le gel devienne incolore. La composition des trois solutions sont indiquées dans le tableau 4. Les deux étapes ont été effectuées sous agitation.

Tableau 4. Composition des solutions de coloration, décoloration rapide et lente

Produits	Solution de coloration	Solution de décoloration rapide	Solution de décoloration lente
Bleu de Coomassie	2,5 g	--	--
Méthanol	450 mL	74,8 mL	150 mL
Acide acétique	100 mL	448 mL	100 mL
H ₂ O MilliQ	Jusqu'au 1000 mL	Jusqu'au 1000 mL	Jusqu'au 1000 mL

Les images ont été capturées et numérisées en utilisant le système de documentation de gel GelDoc 200 Bio-Rad (West Berkeley, Californie, États-Unis) couplé d'un émetteur d'une lumière blanche pour visualiser les bandes de protéines et un appareil photo numérique. Ces images ont été analysées avec Quantity One 4.5.2 logiciel Bio-Rad.

Le coefficient de similitude (Jaccard coefficient) (Ghazi et al., 2009) entre les différentes souches a été calculé selon l'équation suivante :

$$Sab = Ns / Ns + Nd \quad \text{Eq. (1)}$$

Où "Sab" est le coefficient de similitude entre deux souches (a) et (b), "Ns" est le nombre des bandes similaires ayant le même poids moléculaire entre les deux souches (a) et (b) et "Nd" est le nombre des bandes différentielles n'ayant pas le même poids moléculaire. Pour le convertir en pourcentage, le coefficient sera multiplié par 100.

9- Quantification des EPS

La quantification des EPS a été réalisée en trois essais, à partir des surnageants des cultures à A_{600nm} de 1,5, sur milieu CDM supplémenté avec 2% du saccharose, des vingt-huit souches identifiées. Après élimination des cellules par centrifugation à 9.300 x g pendant 10 min à 4 °C. Les EPS présents dans un volume de surnageant de 0,5 mL ont été précipités avec 1,5 mL d'éthanol absolu à -20 °C pendant 12 h. Les EPS précipités ont été récupérés par centrifugation

à 9,300 x g pendant 20 min à 4 °C, lavés deux fois avec de l'éthanol à 80% froid et centrifugés à nouveau pendant 9,300 x g pendant 20 min à 4 °C. Les EPS sédimentés ont été ensuite séchés à l'air libre, remis en suspension dans de l'eau distillée stérile et chauffés pendant 10 min à 30 °C pour faciliter la solubilisation. La teneur totale en sucres a été déterminée par la méthode phénol-sulfurique (Dubois et al., 1956). A 0,5 mL de la solution des EPS, 0.5 mL de phénol à 5% et 2,5 mL d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés séquentiellement (Nacher-Vazquez et al., 2015).

Immédiatement, les échantillons ont été incubés à 100 °C pendant 5 min dans un bain marie. La réaction a été stoppée en plaçant les échantillons dans la glace. Pour effectuer la quantification, l'absorption a été mesurée à 490 nm (A_{490nm}) et les valeurs obtenues sont comparées avec celles de la courbe d'étalonnage obtenue avec des concentrations connues de D-glucose (Fig. 12).

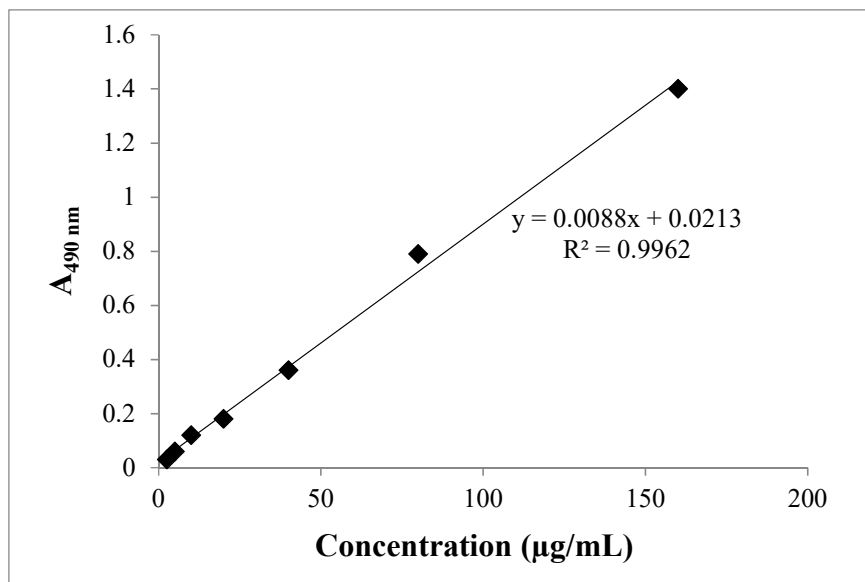


Figure 12. Courbe d'étalonnage de D-glucose. Représentation des valeurs de A_{490nm} obtenues par la méthode phénol-acide sulfurique en fonction des concentrations connues de D-glucose.

Le principe de cette méthode repose sur le fait que l'ajout d'acide sulfurique provoque l'hydrolyse des polysaccharides. Les glucides en milieu acide sulfurique et à chaud sont déshydratés en dérivés du furfural, ces derniers se combinent facilement avec le phénol en donnant une coloration orangée. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la quantité de sucre présent (dosage colorimétrique) et est directement mesurable par spectrophotométrie. La réaction est sensible et la couleur est stable dont de petites quantités de carbohydrates peuvent être détectées.

10- Détection et localisation des EPS

L'étude approfondie de la caractérisation des EPS produits a été réalisée en utilisant les quatre souches isolées localement CM9, CM30, SM34 et CM70, en plus des deux souches de la collection références *L. mesenteroides* RTF10 et *Lb. sakei* MN1.

10-1- Au niveau macroscopique sur milieu solide

Pour détecter phénotypiquement la production des EPS et leur forme, des cultures des souches, citées précédemment, ont été cultivées dans le milieu liquide MRSG jusqu'à A_{600nm} de 1,0. Ensuite, 100 μ l des dilutions appropriées sont ensemencés par stries sur les milieux gélosés MRSS et MRSG contenant 2% du saccharose et 2% du glucose, respectivement, et incubés à 30 °C en suivant la croissance, la forme et le type des colonies pendant 120 h. Les plaques ont été photographiés avec un appareil photo FinePix S5 Pro (Fujifilm, Tokyo, Japon) avec un objectif AF Micro Nikkor 60 mm par le service de Photographie (CIB).

10-2- Au niveau microscopique par microscope électronique de transmission

Pour détecter la localisation des EPS produits, des observations par la microscopie électronique à transmission (MET) ont été effectuées. Une colonie de chaque souche sur plaque d'agar MRSS de chaque souche a été soigneusement suspendue dans 50 μ L d'eau distillée stérile pour former une suspension qui a été par la suite soumise à une coloration négative (Maeyama et al., 2004). Pour cela, des grilles revêtues d'un film formvar-carbone ont été utilisées. Immédiatement avant l'utilisation, les grilles ont été soumises à une décharge ionique pendant une minute. Ensuite, elles ont été mises en contact avec gouttelette de chaque suspension. Après 30 sec, chaque grille a été enlevée, lavée, passé brièvement sur un papier filtre et colorée négativement avec de l'acétate d'uranyle à 2% suivie d'un séchage à l'air libre. Les échantillons ont été examinés en utilisant le microscope JEOL 1230 opéré à 100 kV.

11- Métabolisme du saccharose, production du glucose, fructose, mannitol, l'acide lactique et des EPS durant un suivi de la cinétique de croissance

Pour voir leur comportement en présence du saccharose comme seule source de carbone, les souches sélectionnées ont été cultivées dans le milieu MRSS liquide jusqu'à une A_{600nm} de 2,0, les cellules sont ensuite centrifugées à 9.300 x g pendant 10 min à 4 °C, lavées et remises en suspension dans le même volume du milieu initial. Cette suspension est ensuite diluée à 1:100 dans 100 mL du milieu CDM additionné de 0.8% du saccharose (CDMS). Les fermentations

ont été réalisées à partir de trois cultures indépendantes, cultivées dans un bain thermostaté sans agitation pendant 24 h à 30 °C. Chaque heure, des échantillons sont prélevés pour (i) mesurer la densité optique à 600nm, (ii) mesurer le pH extracellulaire, (iii) quantifier les EPS produits selon la méthode phénol-sulfurique et (iv) déterminer la concentration du saccharose en cours de consommation et ces métabolites : le glucose, le fructose, le mannitol et l'acide lactique. L'expérience a été achevée dans trois essais indépendants.

Pour déterminer la concentration de saccharose et ces métabolites, les échantillons ont soumis à une centrifugation à 9300 x g pendant 10 min à 4 °C. Les surnageants ont été divisés en deux, la première partie a été utilisée pour la quantification des EPS (comme cité précédemment), tandis que la deuxième a été utilisée pour la détermination de la concentration des autres métabolites en mélangeant 100 µL du surnageant avec 100 µL de myo-inositol en tant qu'étalon interne (100 µg) suivi d'une lyophilisation.

Pour la dérivation, 185 µL d'une solution de chlorure d'hydroxylamine dans la pyridine à 2,5% ont été ajoutés au échantillons lyophilisé et incubés pendant 30 min à 70 °C, pour former les oximes des sucres. Après ce temps, 115 µL de bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide ont été ajoutés pendant 45 min à 80 °C, pour former les dérivés triméthylsilylés. L'analyse des sucres a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-MS 7980A-5975C Agilent (Santa Clara, Californie, États-Unis) équipé d'une colonne HP-5MS (30 m x 0,25 mm et une épaisseur de film de 0,2 µm), d'un injecteur "split/splitless" et avec l'hélium comme gaz porteur. Le pique de chaque sucre dans le chromatogramme a été déterminé en comparant son temps de rétention avec celui du mélange des substances d'étalonnage en différentes concentrations avec une quantité constante d'étalon interne. La quantification a été effectuée en déterminant la surface du pique.

La caractérisation de la croissance bactérienne est réalisée par la détermination du taux de croissance moyen (μ) dans la phase exponentielle. Le taux de croissance représente le nombre de division bactérienne par heure, il correspond à la pente de la phase exponentielle de croissance de la courbe log N. Les taux de croissance sont calculés selon l'équation de Monod : $N = N_0 2^{\mu t}$ ou N est la densité bactérienne. Les taux de croissance sont alors calculés en choisissant deux points dans la phase exponentielle et leur points correspondants du temps (Widdel, 2007), en appliquant l'équation suivante :

$$\mu = (\ln A_{600 \text{ finale}} - \ln A_{600 \text{ initiale}}) / (t_2 - t_1) \quad \text{Eq. (2)}$$

Tandis que, le temps de génération, le temps nécessaire au doublement de la population (en minutes), a été déterminé en appliquant l'équation suivante :

$$T_D = G = 1/\mu \quad \text{Eq. (3)}$$

Les vitesses spécifiques de chaque paramètre ont été estimées par régression linéaire dans la phase exponentielle et le calcul de la pente représente la vitesse appropriée.

12- Analyse et caractérisation structurale des EPS

12-1- Production et isolement

Les surnageant récupérés après 24 h d'incubation des cultures utilisés dans l'étude de cinétique de croissance, d'acidification, de consommation du saccharose et production des métabolites correspondants ont été employés pour la caractérisation des EPS.

L'isolement des EPS a été effectué en ajoutant le même volume d'éthanol absolu pour assurer leur précipitation et cela pendant 24 h à 4 °C. Par la suite, le mélange a été centrifugé à 10651 x g pendant 60 min à 4 °C, le précipité contenant l'EPS a été séché à t.a et remis en suspension dans de l'eau distillée stérile (Notararigo et al., 2013).

12-2- Purification des préparations

La solution d'EPS a été soumise à une dialyse pendant 2 jours avec plusieurs changements d'eau distillée en utilisant une membrane d'un Cut off de 12-14 kDa. La solution dialysée a été ensuite congelée à -80, lyophilisée pendant 3 jours et maintenue à t.a. Les EPS lyophilisés ont été remis en suspension dans de l'eau ultra-pure stérile à une concentration de 2 mg par mL et centrifugés pour éliminer toute matière insoluble. Le surnageant a été chargé sur une colonne préparative de Sepharose CL 6B (60 cm x 2,6 cm) équilibrée avec de l'eau ultra-pure, qui a également été utilisé comme éluant (0,41 mL par min). Les fractions recueillies ont été concentrées en utilisant un évaporateur rotatif, congelées à -80 °C et lyophilisées pendant 3 jours (Notararigo et al., 2013).

12-3- Analyse de la pureté des EPS

La vérification de la pureté des EPS (EPS CM9, EPS CM30, EPS SM34, EPS RTF10 et EPS MN1) a été suivie dans chaque étape d'isolement et de purification. Cette pureté a été évaluée en comparant la teneur en sucre, mesurée par la méthode phénol-sulfurique (Dubois et al., 1956), avec les pourcentages des contaminants qui se trouvent sous forme d'ADN, d'ARN et de protéine. La concentration de ces derniers a été déterminée en utilisant les tests de quantification de fluorescence correspondants (Qubit[®]), en suivant les instructions du produit commercial (Invitrogen). La limite de détection de cette technique par mL est de 0,5 µg pour l'ADN, 20 ng pour l'ARN et 1 µg pour les protéines.

12-4- Détermination de la masse moléculaire des EPS produits

La distribution de masse molaire des EPS purifiés a été analysée par chromatographie d'exclusion couplée à une détection de dispersion de lumière laser multi-angle (SEC-MALLS) suivant le protocole proposé par Nikolic et al. (2012). Chaque échantillon lyophilisé a été remis en suspension (5 mg par mL) dans du NaNO₃ 0,1 M, maintenu sous agitation douce pendant une nuit et centrifugé à 10.000 x g pendant 10 min avant l'analyse. Le système de chromatographie en phase liquide à haute performance (Waters, Milford, MA, États-Unis) est constitué d'un module de séparation Alliance 2.695 connecté à trois détecteurs : un réseau de photodiodes (PDA 996, Waters) contrôlé à 280 nm pour la détection des protéines, un indice de réfraction (RI 2.414, Waters). La détermination de la quantité des EPS a été réalisée en utilisant des courbes d'étalonnage obtenues à partir des EPS standard du même type avec des masses molaires différentes et le MALLS Dawn Heleos II (Wyatt Europe GmbH, Dembach, Allemagne). La quantification des EPS a été effectuée avec le logiciel Empower (Waters) et l'analyse de la distribution des masses molaires avec le logiciel Astra 3.5 (Wyatt Europe GmbH). Deux colonnes SEC placées en série ont été utilisées : TSK-Gel G3.000 PWXL + TSK-Gel G5.000 PWXL protégé avec une seconde colonne de garde TSK-Gel (Supelco-Sigma St. Louis, MO, États-Unis). La séparation a été effectuée à 40 °C en utilisant 0,1 M de NaNO₃ comme phase mobile (Salazar et al., 2009).

12-5- Détermination de la composition monomère

Pour déterminer leur composition en monosaccharides. Les EPS ont été hydrolysés avec de l'acide trifluoroacétique 3M pendant 1 h à 121 °C. Les monosaccharides libérés sont convertis en leurs acétates d'alditols correspondants par réduction avec le tétrahydroborate de sodium (NaBH₄) suivie d'une acétylation (Osaku et al., 2002). L'analyse chromatographique des sucres a été réalisée sur un GC-MS (le même appareil utilisé dans la détermination des métabolites du saccharose). Les échantillons (1 µL) ont été injectés avec un programme de température : (i) 160 °C pendant 5 min ; (ii) de 3,5 °C per min jusqu'à 205 °C et (iii) de 210 °C pendant 0,5 min. Le pique de chaque sucre dans le chromatogramme a été déterminé en comparant son temps de rétention avec celui des standards d'étalonnage analysés dans des conditions identiques en utilisant l'inositol comme étalon interne. La teneur en phosphate a été déduite de la détermination de phosphate inorganique en utilisant un appareil à plasma à couplage inductif 5.500 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, États-Unis). La quantification a été réalisée en tenant compte de la zone correspondante au pique et les facteurs de réponse obtenus avec divers monosaccharides d'étalonnage.

12-6- Détermination du type de substitution : analyses de méthylation

Les EPS produits ont été méthylés par la méthode de Ciacanu et Kerek (Ciacanu et Kerek, 1984) modifiée par Needs et Selvendran (Needs et Selvendran, 1993). Les EPS méthylés ont été hydrolysés avec TFA 3M pendant à 121 °C pendant 1 h pour obtenir des monosaccharides méthylés qui ont été ensuite partiellement transformés en acétates alditols partiellement méthylé correspondants. La réduction et l'acétylation (Laine, 1972) a été réalisée avec une seule modification qui est la réduction avec NaBD₄. Les acétates d'alditols partiellement méthylés sont analysés par GC-MS (utilisée précédemment). L'injecteur et la ligne de transfert ont été maintenues à 250 °C durant l'analyse. Le programme de température était de 160 °C pendant 1 min, puis 2 °C min⁻¹ jusqu'à 200 °C dont il est balayé sur une gamme de m/z entre 40 à 450. Les pics des chromatogrammes ont été identifiés par le temps de rétention et les spectres des masses. La quantification a été réalisée en prenant compte de la zone des pics.

12-7- Spectre infrarouge

Pour compléter la caractérisation des EPS, le spectre infrarouge a été employé. Les échantillons ont été analysés par la technique de KBr. Environ 2 mg de chaque EPS lyophilisé ont été mélangés dans un mortier avec 300 mg de KBr maintenu dans un dessiccateur. Le comprimé a été préparé en utilisant une presse hydraulique exerçant une pression de 2 tonnes pendant 2 min, puis 10 tonnes pendant 6 min. Le spectre a été recueilli dans un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier 4.200 type A (Jasco Corporation, Tokyo, Japon) dans un intervalle de 400-4000 cm (Notararigo et al., 2013).

13- Amplification et séquençage du gène responsable de la production des EPS

13-1- Détection du gène partiel *dsr*

Pour détecter le gène *dsr* codant pour l'enzyme clé de la production du dextrane, la dextrane-saccharase, présente chez certaines bactéries lactiques, une amplification par PCR a été réalisée en utilisant les amorces suivantes : DsrF (5' GATGATGGTCAATATATGGCAA 3') et DsrR (5' CTTGAACGATATTGTGGTGCCAA 3') (Sigma). Le design a été réalisé en comparant 14 séquences de *dsr* publiés dans GenBank afin de délimiter le fragment d'ADN de la région codante conservée, située au site catalytique de l'enzyme.

L'amplification a été réalisée en testant ADN_P et ADN_G des souches de *Leuconostoc* isolées. Dans un milieu réactionnel de 50 µL, on a ajout 10 ng d'ADN_P ou 100 ng d'ADN_G comme matrice, 5 µL de 10 x PCR Buffer (-Mg), 1.5 µL de MgCl₂ à 50 mM, 1 µL de dNTPs Mix, 2,5

μL des amorces oligonucléotidiques (sens et anti-sens) citées précédemment à $10 \mu\text{M}$ et $0,2 \mu\text{L}$ de *Taq* DNA polymérase (5 U par μL). La réaction de PCR a été lancée suivant le cycle de température [3 min à 94°C puis 30 cycles (45 sec à 94°C , 30 sec à 47°C , 30 sec à 72°C), puis 10 min à 72°C], à l'aide d'un thermocycleur TC-512 (Techne, Stone, Reino Unido).

Un contrôle négatif en absence d'ADN a été réalisé pour chacune des réactions PCR suivant le cycle de température décrit précédemment.

Des aliquotes de produits d'amplification ont été analysées sur gel d'agarose à 0.8% pour vérifier la présence de l'amplicon et déterminer sa taille. Cette dernière a été calculée en comparant l'intensité des bandes d'ADN avec les fragments ayant une taille similaire et une concentration connue de l'ADN marqueur Smart Ladder.

13-2- Purification du produit de la PCR et séquençage

Pour pouvoir séquencer l'amplicon issu de la PCR, il faut le purifier en quittant les amorces employées. Pour cela, la purification est réalisée avec le Kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen) en suivant les indications du fabricant. La vérification de la pureté de l'amplicon et la détermination de sa taille ont été déduites en faisant migrer une aliquote d'ADN sur un gel d'agarose de 1%. Pour le séquençage, 20 ng par μL d'ADN et $5 \mu\text{M}$ de l'amorce dsrF ont été mélangés dans le même tube et envoyés au service de séquençage.

14- Propriétés rhéologiques des EPS

14-1- Détermination du comportement rhéologique

Pour la détermination des comportements rhéologiques de l'EPS étudié, le polymère lyophilisé, obtenu après précipitation et dialyse, a été dissous dans de l'eau ultrapure pour préparer douze concentrations (0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1%, 1,25 %, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 4% et 5%). Ces solutions ont été préparées à t.a pour éviter la dénaturation qui pourrait se produire à des températures élevées, il est indispensable de les maintenir à l'état de repos avant chaque analyse. Les mesures rhéologiques ont été effectuées dans un visco-élastomètre Thermo-Haake Rheostress I (Fig. 13), équipé d'une géométrie de plaque conique (diamètre de 60 mm, angle de cône 2°). Toutes les mesures ont été effectuées avec deux étapes après l'emplacement des échantillons (2 mL), la première était une étape de repos pour maintenir la température d'essai pendant 3 min sans cisaillement, tandis que dans la deuxième étape, un intervalle de cisaillement entre 1 et 500 par s a été réalisé pendant 3 min. Chaque expérience a été répétée au moins trois fois. Le comportement d'écoulement continu en régime permanent a été analysé à partir des données de viscosité apparente et de taux de cisaillement en utilisant Haake

Rheowin Data Manager. La viscosité au cisaillement près de zéro (η_0) ou autrement dit, la viscosité Newtonienne, a été obtenue par extrapolation et régression en utilisant le modèle de Cross (Cross, 1965):

$$\eta = \eta_0 / (1 + (\lambda \cdot \dot{\gamma})^{1-n}) \quad \text{Eq. (4)}$$

Où " η " est la viscosité apparente, " λ " est la constante de temps liée aux temps de relaxation du polymère en solution, " $\dot{\gamma}$ " est le taux de cisaillement et " n " est l'indice de comportement d'écoulement de loi de puissance.

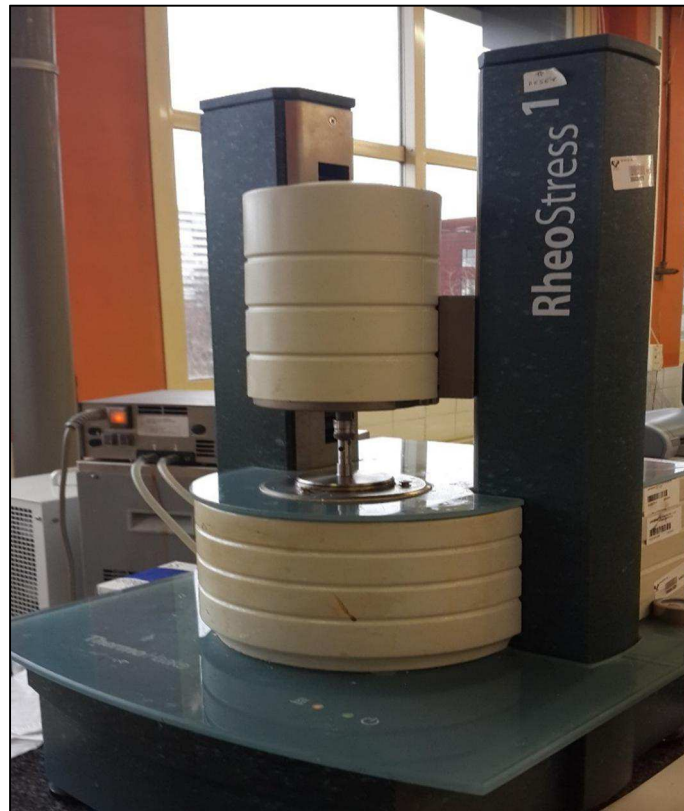


Figure 13. Viscoélastomètre Thermo-Haake Rheostress I

14-2- Détermination de la concentration critique et le type des chaînes

Afin de compléter l'étude rhéologique, la concentration critique de chaque EPS analysé a été déterminée. Pour cela, la variation de la viscosité Newtonienne (η_0) en fonction des douze concentrations (C) a été déterminée en utilisant l'équation de loi de puissance suivante :

$$\eta_0 = k \cdot c^a \quad \text{Eq. (5)}$$

Où " a " et " k " sont les constantes à déterminer à partir du tracé log-log de la viscosité en fonction de la concentration des solutions d'EPS (Velasco et al., 2009).

15- Activité immunomodulatrice des EPS

Pour étudier l'effet immunomodulateur des EPS produits par les BL, la lignée cellulaire THP-1, des monocytes humaines, a été utilisée comme un modèle *in vitro* pour étudier la réponse immunitaire (Kohro et al., 2004).

15-1- Préparation et conditions de culture de la lignée cellulaire THP-1

Les cellules THP-1 sont obtenues à partir de la banque de cellules du CIB. Les cellules ont été cultivées dans du milieu RPMI 1.640 (Gibco) additionné de 10% de sérum bovin fœtal inactivé par la chaleur (Gibco), de pénicilline (100 U par mL) et de streptomycine (100 µg par mL), ce qu'on appelle RPMI complété, à 37 °C dans un incubateur contenant 5% de CO₂. Un renouvellement du milieu a été réalisé tous les deux dans des flasques de 75 cm² de surface de culture. Ce renouvellement a été effectué via une centrifugation à 120 x g pendant 5 minutes à t.a. Le culot a été suspendu dans du milieu frais et les cellules ont été comptées sur cellule de Malassez. Cette étape est nommée « passage ». Les cellules sont utilisées jusqu'au passage 20 et sont maintenues à une densité cellulaire inférieure à 1 million de cellules par mL.

Les monocytes THP-1 sont différenciés en macrophages grâce à un traitement par phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Les cellules, ensuite, ont étéensemencées en plaques 12 ou 96 puits (Falcon). La différenciation est réalisée avec 40 nM de PMA au moment de l'ensemencement des cellules en plaques au jour 0. La différenciation est contrôlée au microscope à inversion (Eclipse TS100, Nikon, Champigny sur Marne, France) grâce à l'adhésion des cellules accompagnée d'un changement de morphologie (Chanput et al., 2010).

15-2- Mesure de la cytotoxicité des EPS

Pour vérifier les effets néfastes et toxiques possibles des traitements des cellules THP-1 avec l'EPS dans les modèles, *in vitro*, la viabilité cellulaire a été déterminée par le kit de prolifération cellulaire II XTT (2,3-bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) (Roche, Allemagne), en suivant les recommandations du fournisseur : 100 µL des cellules THP-1 ont été cultivés et additionnés de 40 nM de PMA (pour la différenciation) dans le milieu RPMI complété, pendant 24 h dans une plaque de 96 puits à une concentration de 10⁵ cellule par mL à 37 °C avec 5% de CO₂. Le milieu de culture a été aspiré soigneusement et remplacé par les solutions d'EPS à différentes concentrations (5 µg, 10 µg, 25 µg, 50 µg, 100 µg, 200 µg par mL), diluées dans le milieu Krebs (Sigma-Aldrich). Un Témoin négatif des cellules non traitées (sans EPS) a été additionné pour établir la comparaison. La plaque a été, directement,

incubé à 37 °C avec 5% de CO₂ (à atmosphère humide). Après 18 h de traitement, 50 µL d'une solution contenant les réactifs XTT1 (réactif de marquage) et XTT2 (réactif de couplage d'électrons) (en proportion 50:1, respectivement) ont été ajoutés à chaque puit et incubés pendant 4 h. l'absorbance à 450nm a été déterminée avec le lecteur de microplaques (Bio-rad 680). Toutes les incubations ont été réalisées dans les conditions décrites ci-dessus.

L'expérience est basée sur la capacité des cellules vivantes à réduire le sel de tétrazolium XTT en formazan de couleur orange. Le colorant formé est hydrosoluble et son intensité est estimée par spectrophotométrie. L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre des cellules vivantes.

Le calcul de la viabilité cellulaire a été réalisée via la quantification de la conversion de XTT en formazan, après l'exposition des échantillons à XTT (XTT1 + XTT2). Ce calcul est relatif, il dépend du contrôle négatif non traité pris comme 100% de la viabilité cellulaire. Le calcul a été effectué en utilisant la formule suivante :

$$\text{Variabilité cellulaire (\%)} = (A_{450\text{nm}} \text{ cellules traitées} / A_{450\text{nm}} \text{ cellules contrôles}) \times 100 \quad \text{Eq. (6)}$$

15-3- Montage de l'expérience par l'addition des EPS

L'expérience a été établie en suivant le protocole proposé par Chanput et al. (2010). 1 mL des cellules THP-1 ont été mises en plaques de 12 puits à une concentration finale de 10⁶ cellules par puit, le passage de ces cellules des monocytes aux macrophages a été assuré en additionnant au milieu RPMI complété, 40 nM de PMA. La plaque est ensuite incubée pendant 72 h à 37 °C avec 5% de CO₂ dans des plaques de culture cellulaire de 12 puits.

Les cellules différenciées, adhérentes au fond des plaques ont été lavées deux fois avec le même milieu sans PMA et incubées pendant 24 h à 37 °C. Ensuite, les cellules PMA-THP-1 ont été co-stimulées avec 700 ng par mL des lipopolysaccharides *Escherichia coli* O111: B4 (LPS, Sigma) et avec les EPS purifiés par chromatographie d'exclusion (100 µg par mL) pendant 18 h dans les mêmes conditions d'incubation. Les surnageants de culture sans cellules ont été recueillis et stockés à -80 °C après une centrifugation à 9300 x g pendant 10 min à 4 °C pour des analyses postérieures. Des contrôles négatifs (PMA-THP1 sans EPS et THP-1 sans PMA et sans EPS) ont été réalisés dans la même expérience. Les dextrans commerciaux T10, T40, T2000 (Pharmacia Biotechnology AB, Suède) ont été utilisés aussi comment traitement des macrophages dans le but de comparer leurs réponses avec celles des EPS natifs.

15-4- Détermination des niveaux de cytokines

Les profils d'expression des protéines de cultures cellulaires des cytokines ont été analysés pour voir leur réponse après le traitement par les EPS pures. Cette expression a été déterminée par ELISA (Kit BD OptEIA™, BD biosciences, États-Unis). Les cytokines analysées dans les surnageants de macrophages sont les cytokine pro-inflammatoire TNF- α et anti-inflammatoire IL-10. Les kits ont été utilisés en suivant les instructions du fournisseur. Les concentrations de cytokines, exprimées en pg, ont été extrapolées à partir de la ligne de régression générées en utilisant les valeurs d'absorbance des courbes d'étalonnage déterminées dans le même essai avec des concentrations connues de cytokines commerciales (Chanput et al., 2010).

16- Formation des biofilms

Un biofilm est formé d'une seule espèce ou d'une communauté plus ou moins complexe de microorganismes, adhérant entre eux et à une surface produisant ainsi une matrice protectrice résistante. Pour détecter la formation des biofilms par les souches de *Leuconostoc* isolées, le protocole modifié de Toledo-Arana et al. (2001) a été suivi en utilisant une plaque de 96 puits. Les souches CM9, CM30, CM70 ont été cultivées sur milieu MRSG jusqu'à une A_{600nm} de 0,6. La souche *Lb.sakei* MN1 a été utilisée comme un contrôle positif et le milieu seul, comme un contrôle négatif. Les cultures ont été diluées 1:100 dans MRSG et MRSS. 200 μ L de ces deux nouvelles suspensions ont été déposés dans chaque puit de la plaque qui a été incubée, ensuite, à 30 °C sans agitation pendant 48 h afin de permettre l'adhésion des bactéries au support. Le milieu de culture a été éliminé et les cellules, en puits, ont été lavées, soigneusement, 3 fois avec 200 μ L de PBS ou H₂O ultrapure stérile. Après séchage à t.a, 125 μ L de cristal violet à 0.4% ont été ajoutés à chaque puit, suivie d'une incubation à t.a pendant 15 min. Après, les puits ont été lavés 3 fois avec 200 μ L de PBS ou H₂O ultrapure stérile et le complexe du cristal violet a été bien solubilisé en ajoutant 200 μ L d'éthanol absolu. L'absorbance à 595nm de chaque puit a été mesurée en utilisant le Varioskan flash (Thermo Fisher Scientific).

17- Effet probiotique

Vu l'aptitude technologique et l'effet bénéfique des BL appartenant au groupe des probiotiques, connus par leurs diverses applications alimentaires. Plusieurs tests, applicables comme critères de sélection des souches à potentiel probiotique, ont été réalisés en expérimentant les souches CM9, CM30 et CM70. Chaque expérience a été établie en triple.

17-1- Résistance à l'acidité

L'aptitude des leuconostocs à résister à l'acidité gastrique, a été déterminée selon la technique décrite par Hyronimus et al. (2000) : Une préculture bactérienne d'une A_{600nm} de 1,0 a été centrifugée, lavée et inoculée dans des tubes de 10 mL du bouillon MRS ajustée préalablement à pH 2, pH 3 et pH 7, puis incubée à 30 °C. Des dénombrements bactériens sur boîte de pétri ont été effectués au moment de l'inoculation (t_{0h}) et après 3 h d'incubation (t_{3h}). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de bactéries dénombrées après incubation par rapport à la concentration initiale.

$$\text{Taux de survie (\%)} = (\log \text{ ufc à } T_{3h} / \log \text{ ufc à } T_{0h}) \times 100 \quad \text{Eq. (7)}$$

17-2- Résistance aux sels biliaires

Pour la détermination de l'aptitude des souches à résister à la bile, la méthode décrite par Hyronimus et al. (2000) a été appliquée : Une préculture bactérienne d'une A_{600nm} de 1,0 a été centrifugée, lavée et inoculée dans des tubes de 10 mL du bouillon MRS additionné de 0,3%, 1%, 2% de sels biliaires avec l'emploi du témoin (sans sels biliaires). Les tubes ont été ensuite incubés à 30 °C pendant 3 h. Des dénombrements bactériens sur boîte de pétri ont été effectués au moment de l'inoculation (t_{0h}) et à la fin de l'incubation (t_{3h}). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de bactéries dénombrées après incubation par rapport à la concentration initiale suivant Eq. (7).

17-3- Résistance à la pepsine

La capacité de résister aux enzymes digestives, comme la pepsine, a été étudiée selon le protocole proposé par Hosseini et al. (2009) : Une préculture bactérienne d'une A_{600nm} de 1,0 a été centrifugée, lavée et inoculée dans des tubes de 10 mL du bouillon MRS supplémentés de 3 mg par mL de pepsine et ajustés préalablement à pH 2 et pH 3. Les tubes, ensuite, ont été incubés à 30 °C pendant 3 h. Des dénombrements bactériens sur boîte de pétri ont été effectués au moment de l'inoculation (t_{0h}) et à la fin de l'incubation (t_{3h}). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de bactéries dénombrées après incubation par rapport à la concentration initiale suivant Eq. (7).

17-4- Réponse au stimulus stomaco-duodéal

Pour tester la réponse des leuconostocs au stimulus stomaco-duodéal contenant plusieurs barrières, la technique décrite par Vizoso Pinto et al. (2006) a été appliquée: à partir d'une préculture bactérienne, des dilutions (1/10) dans la solution de Ringer (NaCl 9 g, KCl 0,42 g,

CaCl₂ 0,48 g et NaHCO₃ 0,2 g par L) ont été réalisées. 10 mL du bouillon MRS à pH 3 a été inoculé par 1 mL de cette suspension bactérienne diluée, suivie d'une détermination du nombre de bactéries à zéro heure. Après 1 h d'incubation à 30 °C, 4 mL de sels biliaires reconstitués à raison de 10% et 17 mL d'une sécrétion duodénal synthétique (NaHCO₃ 6,4 g, KCl 0,239 g, NaCl 1,28 g par litre) ont été ajoutés. Après cette préparation finale, les cultures ont été incubées pendant 3 h. Durant l'incubation, la détermination du nombre de cellules viables après 1 h et 3 h d'incubation a été effectuée, en calculant, le taux de survie selon Eq. (7).

17-5- Test d'hydrophobicité

L'hydrophobicité bactérienne est considérée comme l'un des facteurs les plus importants qui influence l'adhésion des cellules à divers supports. Pour tester ce caractère chez les leuconostocs, le protocole proposé par Iyer et al. (2010) a été suivi : une préculture bactérienne a été centrifugée, lavée deux fois et resuspendue dans du tampon urée phosphate magnésium (pH 6,5). L'absorbance initiale de la suspension a été ajustée à 1 (A_{initiale}). La suspension bactérienne a été alors additionnée de 0,6 mL du xylène, incubée à 30 °C pendant 10 min et ensuite agitée au vortex pendant 2 minutes. Après un repos de 15 min à 30 °C, la phase aqueuse a été récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur pour mesurer son absorbance (A_{finale}).

La différence de l'absorbance est considérée comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%) calculé par l'équation suivante :

$$\text{Hydrophobicité (\%)} = (A_{\text{initiale}} - A_{\text{finale}} / A_{\text{initiale}}) \times 100 \quad \text{Eq. (8)}$$

17-6- Résistance au phénol

La capacité des leuconostocs à résister à une faible concentration du phénol est déterminée selon la méthode décrite par Kılıç al. (2013) : 1% d'une préculture bactérienne a été inoculée dans le bouillon MRS additionné de 0.4% de phénol (t_{0h}) puis incubé à 30 °C pendant 24 h (t_{24h}). La résistance des souches au phénol a été estimée par le dénombrement des cellules viables par la technique de micro-dilution, avant et après l'incubation en suivant Eq. (7) en remplaçant le t_{3h} par t_{24h}.

17-7- Test de la thermorésistance

Le test de la thermorésistance des souches du genre *Leuconostoc* a été réalisé selon la méthode décrite par Hasseini *et al.*, 2009. 0,1 mL de chaque préculture des souches testées a été placées dans des tubes stériles qui ont été mis par la suite dans un bain marie à deux températures différentes : 60 °C et 80 °C et cela pendant 1 min et 5 min. Les cellules viables ont été comptées

sur milieu MRS agar, avant et après traitement et incubées à 30 °C pendant 24 h. le taux de survie est calculé suivant Eq. (7).

17-8- Antibiogramme

L'antibiogramme des souches de *Leuconostoc* est déterminé par la technique standardisée de diffusion (D'après le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, 2004) sur milieu gélosé, MRS agar. À partir d'une préculture en milieu MRS et à l'aide d'un écouvillon stérile, un ensemencement a été réalisé sur toute la surface du milieu MRS agar. Après le séchage des boîtes, les disques d'antibiotique ont été déposés soigneusement. Les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 18 h à 24 h.

Selon Vlková et al. (2006) et Liasi et al. (2009), les diamètres des zones d'inhibition observés classent les bactéries lactiques comme chimiquement sensibles, S (≥ 21 mm), intermédiaires, I (16-20 mm) ou résistantes, R (≤ 15 mm), à un antibiotique donné. Les antibiotiques testés sont : ampicilline (10 μ g), amoxycilline plus clavulanate (20 μ g plus 10 μ g), cefazoline (30 μ g), cefotaxime (30 μ g), cefoxitine (30 μ g), ofloxacine (5 μ g), oxacilline (1 μ g), pefloxacine (5 μ g), pénicilline (6 μ g), tétracycline (75 μ g), vancomycine (30 μ g) (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France).

17-9- Activité antimicrobienne

La capacité des leuconostocs à inhiber la croissance des bactéries indésirables en produisant des substances antimicrobiennes a été déterminée par les deux méthodes de détection.

a- Méthode directe

L'activité antimicrobienne des souches a été évaluée sur milieu solide selon la méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983). Le milieu MRS standard et le milieu MRS tamponné à un pH 7 ont été ensemencés en touche par les souches de *Leuconostoc*. Après 24 h d'incubation à 30 °C, une couche de gélose moelle (0,7%), ensemencée séparément par les souches de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, a été coulée à la surface. Les boîtes ont été ensuite réincubées pour 24 h à 48 h supplémentaires. Les souches présentant une zone claire tout autour de la touche ont été considérées comme productrices de substances antimicrobiennes.

b- Méthode indirecte

Cette méthode permet de mettre en contact avec la souche indicatrice, le surnageant des souches présentant déjà un halo via la méthode directe, susceptibles de produire des substances antimicrobiennes. Ce test est établi pour déterminer la nature de l'agent inhibiteur.

Les précultures des cultures le milieu est centrifugé à 9200 x g à 4 °C pendant 10 min. Des puits ont été réalisés dans des boîtes de Pétri, contenant le milieu MRS solide avec la souche indicatrice, avec un emporte-pièce et celé par 10 µl de gélose MRS. 100 µl du surnageant de la productrice a été déposé dans chaque puit et les boîtes sont incubées pendant 24 h à 48 h à 37 °C. Les puits entourées d'une zone claire dans la nappe de culture de la souche indicatrice et ayant un diamètre supérieur à 2 mm sont considérées comme positive (Lewus et Montville, 1991).

Afin de déterminer la nature de la substance inhibitrice produite, il est nécessaire de réaliser une série de test en éliminant les substances une à une à chaque fois.

- **Inhibition due à la production d'acides organiques**

Les acides produits durant le métabolisme des leuconostocs représentent un facteur majeur dans les inhibitions des plusieurs microorganismes. Afin d'éliminer son effet, les souches ont été cultivées dans du MRS liquide tamponné à pH 7,0 seule la substance antimicrobienne, si elle est produite, exprime son action sur la souche indicatrice (Yang et al., 2012).

- **Inhibition due à une substance de nature protéique**

La recherche de substances antimicrobiennes comme les bactériocines, nécessitent la recherche de la nature de cette substance qui, si elle appartenait aux bactériocines, devrait avoir une nature protéique. Pour la déterminer, 1 mL de la culture bactérienne dans le milieu MRS tamponné à pH 7,0, a été traité par 1 mg de trypsine et incubé à 37 °C pendant 1 h. Le filtrat ainsi traité est stérilisé par filtration sur filtre millipore de 0.22 µm. L'action de ce filtrat est testée par la méthode des puits sur milieu Muller-Hinton (gélose moelle) et incubé à 37°C pour 24 h à 48 h (Mezaini et al., 2009).

17-10- Adhésion *in vitro* aux cellules Caco-2

La capacité d'adhésion à la couche intestinale est un critère de sélection recommenté pour le choix des probiotiques. Elle constitue un mécanisme de défense important vis-à-vis l'invasion des bactéries pathogènes. Pour évaluer ce caractère, les souches de *Leuconostoc* isolées (CM9, CM30 et SM34) ainsi que les souches de collection (RTF10 et MN1) ont été testées pour leur capacité d'adhérer *in vitro* en utilisant la lignée cellulaire Caco-2 qui sont cellules-épithéliales humaine de l'intestin grêle qui se différencient et se polarisent comme des entérocytes coliques. En plus, l'effet de la production d'EPS en milieu saccharosé a été évalué.

a- Préparation et conditions de culture de la lignée cellulaire Caco-2

L'adhérence aux cellules épithéliales a été analysée par l'utilisation de cellules intestinales Caco-2. Ces cellules ont été obtenues auprès de la banque des cellules du CIB. Les cellules ont été cultivées dans des flasques de 25 cm² de surface de culture, en milieu MEM-Alpha (Invitrogen, Barcelone, Espagne), complété avec 20% (v/v) de sérum bovin fœtal inactivé par la chaleur (56 °C, 30 min) ainsi que la pénicilline (100 u par mL) et la streptomycine (100 µg par mL). L'incubation a été effectuée à 37 °C, dans une atmosphère à 5% de CO₂. Le renouvellement du milieu a été réalisé tous les deux jours jusqu'à l'obtention d'un tapis des cellules adhérentes de 70%. A ce niveau, les cellules ont été divisées en deux flasques, cette étape est nommée « passage ». Les cellules ont été récupérées par trypsinisation par la trypsine-EDTA à 0,05% suivie d'une centrifugation à 120 x g pendant 5 minutes à t.a. Le culot a été suspendu dans le milieu MEM frais et les cellules détachées ont été comptées sur cellule de Malassez. Ces cellules sont utilisées jusqu'au passage 20 et sont maintenues à une densité cellulaire inférieure à 1 million de cellules par mL.

b- Montage de l'expérience

Le protocole suivi dans l'expérience est celui proposé par Garai-Ibabe et al. (2010). Après trypsinisation et récupération des cultures adhérentes sur le fond des flasques, 100 µL des cellules détachées ont été ensemencées dans des plaques de culture de 96 puits (Falcon MicrotestTM, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, États-Unis) à une concentration finale de 1,25 x 10⁵ cellules par mL afin d'assurer la croissance d'une monocouche des cellules différenciées et polarisées pendant 21 jours. Le milieu de culture a été renouvelé soigneusement tous les 2 jours. La polarisation et la stabilité des cellules attachées ont été vérifiées, après chaque renouvellement, via le microscope à inversion. Le dernier renouvellement a été réalisé sans l'ajout d'antibiotiques (Nácher-Vázquez et al., 2017).

c- Effet de la production des EPS sur l'adhésion cellulaire

Pour évaluer la capacité des bactéries à adhérer en présence et en absence d'EPS, les cultures des bactéries, citées précédemment, ont été cultivées en MRSG ou MRSS jusqu'à la phase exponentielle puis elles ont été sédimentées par centrifugation à 12000 x g pendant 10 min à 4 °C, les culots ont été remis par la suite en suspension dans les volumes appropriés du milieu essentiel minimum eagle modifié de Dulbecco (DMEM, Invitrogen) qui contient 0,5% de glucose (G) et dans le DMEM additionné de 0,5% de saccharose (S) pour une concentration finale de 1,25 x 10⁶ ufc par mL. 100 µL de cette suspension a été ajoutée dans chaque puit en

utilisant un rapport de 10:1 (bactéries:cellules Caco-2). Les plaques ont été incubées pendant 1 h à 37 °C.

Après incubation, les bactéries détachées ont été éliminées par trois lavages avec 200 µL de PBS à pH 7,1, les cellules Caco-2 ont été séparées de la surface en plastique par incubation pendant 10 min à 37 °C avec 100 µL de trypsine-EDTA à 0,05% par puits. La réaction a été arrêtée en ajoutant 100 µL de PBS à pH 7,1. Les dilutions appropriées ont été étalées sur des plaques de MRSG. Tous les essais ont été effectués en triple. L'adhésion bactérienne a été calculé selon Eq. (9).

$$\text{Taux d'adhésion (\%)} = \left(\frac{\text{le nombre de bactéries adhérees}}{\text{le nombre de bactéries ajoutées aux cellules Caco-2}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (9)}$$

Le contact bactérie/cellule et l'adhésion ont été photographiés en testant la souche *Lb. sakei* MN1[pCR12] marquée par fluorescence avec la protéine mCherry. 1 mL de la souche a été cultivée sur milieu MRSG jusqu'à une A_{600} de 0,38, lavée et resuspendue dans le même volume de DMEM. 100 µL de cette dernière ont été ensuite rajoutés aux cellules Caco-2 déjà différenciés ($1,25 \times 10^5$ cellules/mL) en boîte de Petri en verre, incubé l'ensemble pendant 1 h à 37 °C avec 5% de CO₂. La boîte ensuite a été lavée trois fois par PBS (pH 7) pour éliminer les bactéries détachées flottantes. 100 µL du milieu DMEM ont été rajoutés et les photos ont été prises juste en utilisant le microscope modèle Leica AF6000 LX-DMI6000B (Leica Microsystems, Mannheim, Allemagne).

Lb. sakei MN1[pRCR12] a été construite par Nacher-Vazquez et al. (2017) pour suivre et détecter sa présence dans les essais réalisés. Le plasmide de gamme hôte pRCR12, qui code constitutivement pour la protéine fluorescente mCherry (Russo et al., 2015), a été obtenu à partir de *E. coli* DH5- α [pRCR12] en utilisant le "Kit de purification de plasmide JetStar 2.0" (Genome, Löhne, Allemagne). pRCR12 a été transféré à la souche MN1 comme décrit par électroporation (Berthier, Zagorec, Champomier-Vergès, Ehrlich et Morel-Deville, 1996). Les transformants ont été choisis sur milieu MRSG solide (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960) additionnées de chloramphénicol (Cm) à 5 µg mL⁻¹. La fonctionnalité de mCherry dans MN1 [pRCR12] a été révélée par des colonies de couleur rouge.

18- Essai de la colonisation du poisson zèbre

Pour évaluer la capacité des souches de *Leuconostoc* à coloniser l'intestin, les souches CM9, CM30, SM34 et CM70 ont été testées, *in vivo*, en utilisant le modèle biologique : le poisson zèbre.

18-1- Description du modèle

Le poisson zèbre ou zebrafish est un poisson téléostéen de l'ordre des Cypriniformes (annexe) (Sola et Gornung, 2001), il est largement réparti dans le monde (Europe, Afrique, Asie et Amérique du Nord). Le genre *Danio* est originaire d'Inde, de Malaisie et de Sumatra. On trouve plus particulièrement l'espèce *Danio rerio* en Inde de l'Est. Cet espèce peuple les cours d'eau rapides et peu profonds, mais on peut également le retrouver au sein de rivières à courant lent ou d'étangs (Dooley et Zon, 2000). Son adaptation thermique est importante puisqu'on le rencontre dans des eaux dont la température varie de 10 à 40 °C. il est capable de supporter de larges gammes de pH (6,5 à 8,0). Le poisson zèbre se caractérise par une taille comprise entre 3 et 5 cm au stade adulte (atteint vers l'âge de 100 j). Son corps est fusiforme et très flexible ce qui facilite une progression rapide ainsi que des changements de direction fréquents. Cette espèce se caractérise par un cycle de vie court et son développement embryon-larvaire est très rapide (Fig. 14) (Detrich et al., 2004).

Spécificité de ce modèle :

- 1- Il est aisément maintenu dans les conditions d'un laboratoire (moins coûteux), il est peu exigeant vis-à-vis les caractéristiques de l'eau d'exposition (Température, pH, dureté).
- 2- Sa taille réduite et son caractère grégaire concourent à son adéquation pour des expérimentations nécessitant un grand nombre d'individus.
- 3- Son cycle de vie relativement court lui permet d'être un modèle biologique de choix pour des études couvrant plusieurs générations dans le but d'obtenir des informations relatives aux conséquences populationnelles d'une exposition à des agents.
- 4- Il est important de mentionner que le génome de cette espèce a été récemment séquencé dans sa totalité et il présente 70% d'homologie avec le génome humain. Une caractéristique unique au monde qui fait de cette espèce un intéressant sujet d'étude pour les maladies génétiques (Li et Uitto, 2014)
- 5- Étant transparent, des observations microscopiques peut être faites en temps réel.
- 6- L'emploi d'une petite quantité de composé d'essai par rapport aux autres modèles vertébrés.
- 7- Les embryons de poisson zèbre ont la capacité d'absorber l'eau des composés directement. En outre, les composés d'essai ayant une très faible solubilité peut être évaluée par micro-injection (Detrich et al., 2004).

8- Il n'est pas considéré comme un animal de laboratoire par la directive européenne 86/609/CEE relative à la protection des animaux utilisés pour la recherche expérimentale scientifique jusqu'à 6 jours après la fécondation.

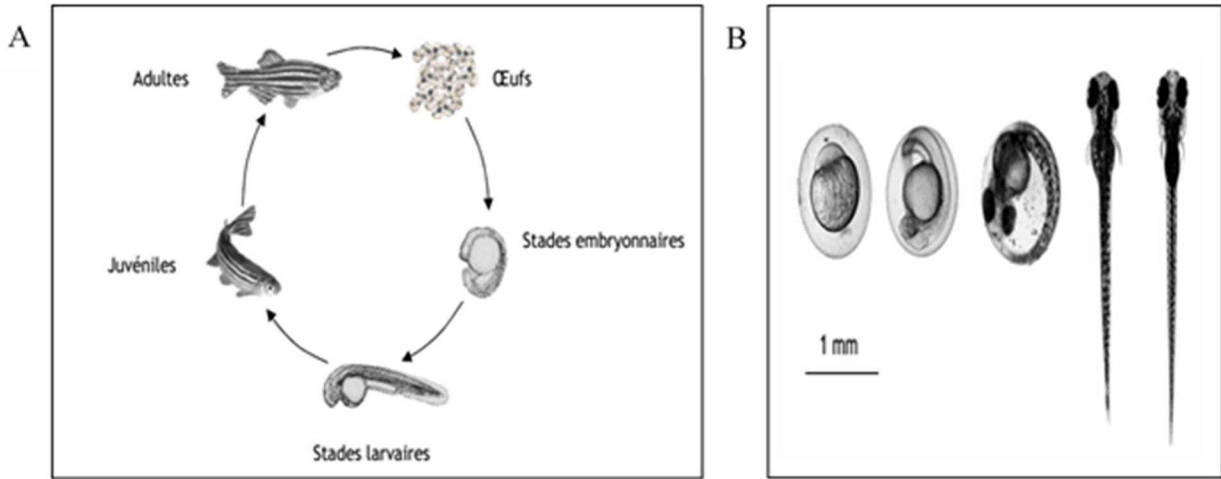


Figure 14. Cycle de vie du poisson zèbre. (A) Description du cycle biologique, (B) Principales étapes de développement embryolarvaire du poisson zèbre (de gauche à droite : 0, 24, 48, 72 et 120 heures après fécondation, hpf) (Detrich et al., 2004).

18-2- Préparation des échantillons et conditions de survie

a- Provenance et transport des œufs

Les œufs des poissons zèbre employés dans l'expérience sont prélevés de l'entreprise Biolabs ZF (Madrid, Espagne), ces œufs ont été obtenus par une fécondation *in vitro*, une technologie exclusive pour obtenir de grandes quantités d'embryons. Ce nouveau système permet d'obtenir des embryons de poisson zèbre de manière contrôlée et planifiée, avec des normes de qualité très élevées. Les œufs ont été transportés dans une t.a dans des flasques de 25 cm² de surface dans leur propre liquide.

b- Préparation des œufs

A l'arrivée au laboratoire, les œufs ont été lavés et préparés dans des conditions aseptiques strictes :

Les œufs ont été transférés à un tube conique stérile par aspiration en utilisant une pipette en plastique. Le maximum du liquide de transport a été éliminé et remplacé par 10 mL de la solution d'isowater A (CaCl₂.2H₂O 0,735 mg, MgCl₂.7H₂O 0,308 mg, NaHCO₃ 0,128 mg, KCl 0,014 mg par L et des traces de bleu de méthylène), le tube a été inversé soigneusement et laissé sédimenter pour éliminer le maximum du liquide. Le tube a été lavé dix fois avec la solution

d'isowater B (Isowater A + sulfate de kanamycine 15 mg, ampiciline 300 mg et anfoterécine B 1.25 mg par L). Après avoir réalisé le dernier lavage, 10 mL de la solution d'isowater C ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,735 mg, $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,308 mg, NaHCO_3 0,128 mg et KCl 0,014 mg par L) a été ajouté et le tube a été inversé soigneusement, sédimenté pour assurer un taux élevé du nettoyage. Les œufs ont été transférés, ensuite, dans un nouveau tube stérile. Deux autres lavages ont été effectués avec la même solution. 10 mL de la solution d'isowater C supplémenté en 10 μL de bétadine à 10% ont été ajoutés et incubés pendant 1 min à t.a en agitant soigneusement. Les œufs ont été aussi lavés dix fois avec la solution d'isowater A et dix fois avec la solution d'isowater B. Les œufs ont été transférés dans une plaque de Pétri stérile avec la même solution où le liquide a été renouvelé en ajoutant 30 mL à 40 mL. La boîte a été scellée avec du parafilm et incubée à 28 °C avec une agitation de 25 rpm en appliquant des cycles de lumière/obscurité de 8 h. Après 24 h d'incubation, un mélange des larves et des œufs non éclos peut être remarqué. Ce mélange a été lavé trois fois avec la solution d'isowater C. Les œufs et les larves ont été répartis en trois groupes dans trois plaques de Pétri stériles (selon les souches à tester) en prenant compte les trois essais à faire pour chaque souche. Les boîtes ont été scellées avec du parafilm et incubées à 28 °C avec une agitation de 25 rpm en appliquant des cycles de lumière/obscurité de 8 h. Après 24 h d'incubation, tous les œufs ont été éclos en donnant des larves avec un très faible pourcentage de mortalité. A cette étape, il était indispensable de recompter les larves, les redistribuer selon le but de l'expérience, les laver deux fois avec la solution d'isowater C, les sceller avec du parafilm et les incuber à 28 °C avec une agitation de 25 rpm en appliquant des cycles de lumière/obscurité de 8 h, en attendant la préparation les cultures bactériennes à tester.

c- Préparation des cultures bactérienne

Les souches CM9, CM30 et CM70 ont été cultivées sur milieu MRS liquide jusqu'à l'obtention d'une $A_{600\text{nm}}$ de 1 (5×10^8 ufc par mL). Les cultures ont été centrifugés à 9200 x g pendant 10 min à 4 °C, le culot a été lavé et resuspendu dans la solution d'isowater C. Le dénombrement initial des cultures a été réalisé sur milieu MRS solide pour pouvoir calculer le pourcentage final de colonisation.

18-3- Essai de la colonisation

Pour commencer le test de colonisation, il est indispensable de laver les larves deux autres fois avec la solution d'isowater C, pour éliminer toute trace de déchet. Les suspensions bactériennes préparées ont été ajoutées directement aux plaques de façon à obtenir 5×10^7 ufc par mL, les

boîtes ont été incubées ensuite dans les mêmes conditions citées auparavant. Après 18 h d'incubation, les larves ont été lavées cinq fois avec la solution d'isowater C pour éliminer le reste des bactéries et transférées dans des autres nouvelles de boîtes de Pétri stériles qui ont été incubées en respectant les mêmes conditions pendant 6 h.

Après 6 h d'incubation, et après avoir éliminé les bactéries et transféré chaque cinq larves dans un eppendorf stérile. Le reste a été gardé pour l'analyse de 24 h.

Les larves, transférées dans les eppendorfs, ont été lavées deux fois avec la solution d'isowater C supplémenté en 0.1% de tween 20. Ces mini-tubes ont été inversées soigneusement suivie par une élimination maximale du liquide. Autre lavage avec la solution d'isowater C a été effectué en répétant les mêmes étapes. 400 µL de la solution d'isowater C ont été ajoutés à chaque eppendorf pour pouvoir écraser les larves avec un pilon à granulés en assurant, alternativement, une agitation au vortex. Chaque 200 µL ont été ensemencés en surface sur milieu MRS solide et incubés à 30 °C pendant 48 h pour déterminer le taux des bactéries capables de coloniser le poisson zèbre. Après 24 h d'incubation des autres larves, les mêmes étapes, précédées auparavant, ont été suivies.

Le taux de colonisation a été déterminé en exprimant le numéro de colonie par larve. L'essai a été répété trois fois dans la même expérience et l'expérience a été répétée deux fois.

19- Traitement bio-informatique des données

Les séquences de nucléotides ont été analysées en utilisant les programmes Chromas 1.45 (Conor Mc Carthy, Université Griffith, Queensland, Australie) et DNASTAR 5.0.1 (Lasergene, Madison, EUA). La recherche d'homologie des gènes et leurs pourcentages ont été effectuées en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Les oligonucléotides (primers) utilisés dans ce présent travail ont été conçus en utilisant le programme OLIGO 3.4 (Med Probe, Oslo, Norvège). L'arbre phylogénétique a été établi en utilisant la méthode Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987). Le logiciel MEGA 7.0.21 (Tamura et al., 2011) a été utilisé pour réaliser les alignements des séquences (ClustalV) et dresser les arbres phylogénétiques correspondants.

Le gel des protéines totales a été traité par le programme Image J, afin de transférer le profil protéique de chaque souche en piques et d'extraire le pourcentage correspond à chaque bande protéique. Le phénogramme final a été tracé avec le programme R, en utilisant la méthode de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

20- Analyse statistique

Dans l'analyse d'adhésion, les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type calculée à partir de trois réplifications indépendantes en triple. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel « one-way analysis of variance » (ANOVA) en utilisant le programme statistique SAS, où le test de tukey a été utilisé pour déterminer les différences significatives entre les variables à $p \leq 0,05$. Dans les expériences d'immunomodulation, les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type calculé à partir d'une réplification en triple. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel ANOVA en utilisant le programme statistique SAS, où le test de dunnett's a été utilisé pour déterminer les différences significatives entre le groupe témoin et les différents groupes de traitement. Les comparaisons significatives au niveau 0,05 sont indiquées par ***.

Résultats

Les BL représentent un groupe hétérogène de microorganismes qui sont principalement utilisées en tant que starters dans les produits alimentaires fermentés où ils permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation. Parmi les genres utilisés en industrie agro-alimentaire, le genre *Leuconostoc*, qui jouent un rôle très important grâce à leurs propriétés métaboliques.

La caractérisation initiale des souches isolées à partir des différents écosystèmes porte sur les caractères phénotypiques. Ceux-ci comprennent des tests physiologiques et biochimiques et des essais métaboliques qui classifient les isolats selon leur profil.

1- Identification phénotypique

1-1- Caractérisation macroscopique et microscopique

Vingt-huit souches isolées de différents habitats ont été analysés. Sur milieu MRS, les colonies purifiées ont une forme ronde, petite et lenticulaire de couleur blanchâtre (Fig. 15A).

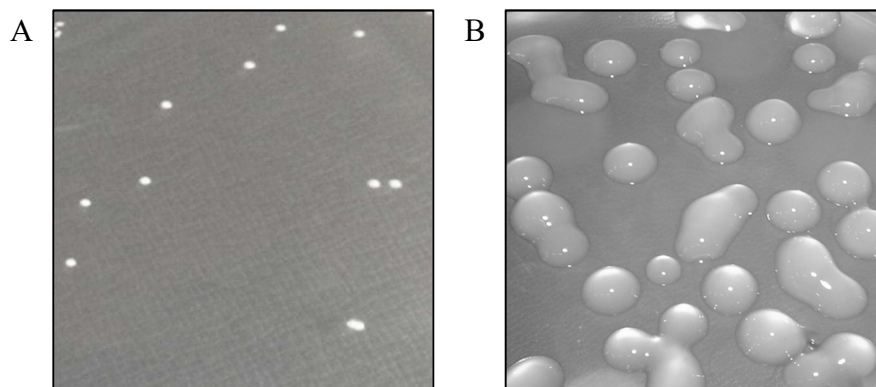


Figure 15. Observation macroscopique des colonies de la souche CM30, cultivée sur milieu solide MRS (A) et sur milieu MSE (B)

Par contre, sur milieu MSE, la plupart des souches ont montré des colonies plus grandes et gluantes (Fig. 15B).

L'étude de l'aspect morphologique au microscope optique après coloration de Gram permet d'éliminer d'éventuels contaminants à Gram négatif n'appartenant pas aux BL et de différencier les bacilles longs en chaînettes des groupes de coques en amas ou en chaînettes.

Le mode de regroupement des coques à Gram positif permet de différencier les leuconostocs associés en chaînettes plus au moins longues des pedicoques, groupés par deux ou en tétrades,

ou des lactocoques, coques groupées en paires ou en chaînes courtes. Toutefois, l'aspect morphologique peut difficilement être utilisé comme critère sûr de reconnaissance.

Tous les isolats appartiennent au groupe des bactéries à Gram positif avec des cellules de forme ovoïde associées généralement en paires et en courtes chainettes lorsqu'on les a observé par microscopie optique (Fig. 16) au par microscopie électronique à transmission (Fig. 17).

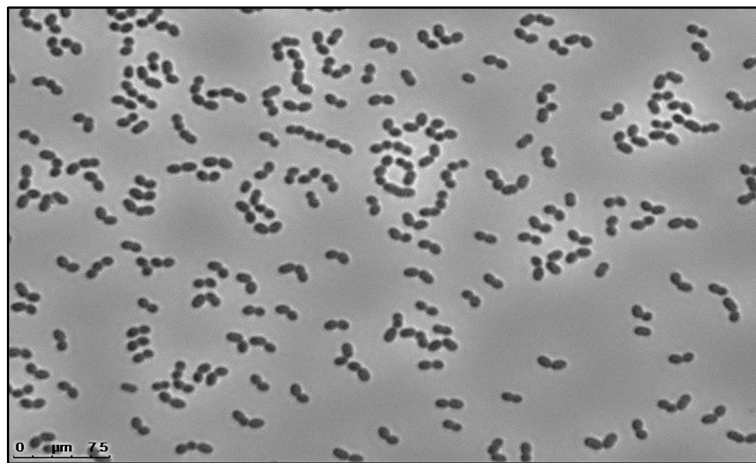


Figure 16. Observation au microscope optique de la forme des cellules et leur mode d'association de la souche CM30, cultivée sur milieu liquide MRSG (Gr x100x10x1,25)

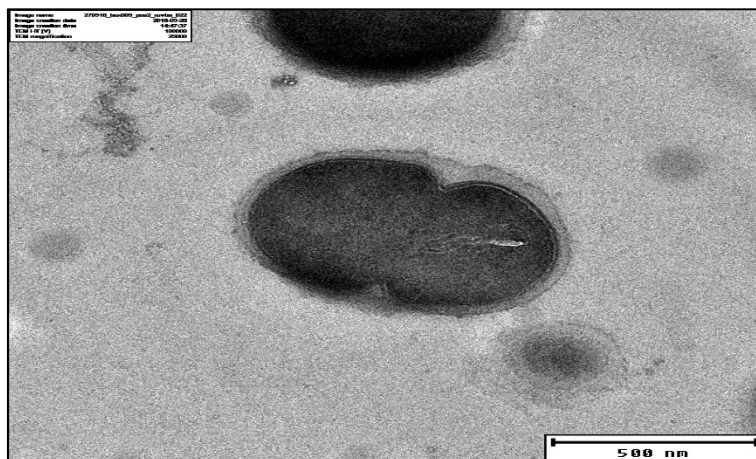


Figure 17. Observation au microscope électronique à transmission d'une cellule issue de la souche CM30, cultivée en sur milieu liquide solide MRSG et coloré par la méthode de rouge de ruthénium

Le test de catalase a révélé l'absence de l'enzyme ce qui reflète l'incapacité des souches à dégrader le peroxyde d'hydrogène.

Cet ensemble des caractérisations, macroscopiques et microscopiques, est considéré comme pré-identification dans la classification des bactéries y compris les BL.

1-2- Identification des isolats

a- Production du gaz à partir du glucose

Ce test constitue la première clé d'identification phénotypique des bactéries lactiques. Le CO₂ produit par la souche testée est capté par un tube contenant la cloche de Durham (Fig. 18). Toutes les souches produisent du gaz carbonique à partir du glucose (Bouillon MRSG), elles sont classifiées comme des BL hétérofermentaires.

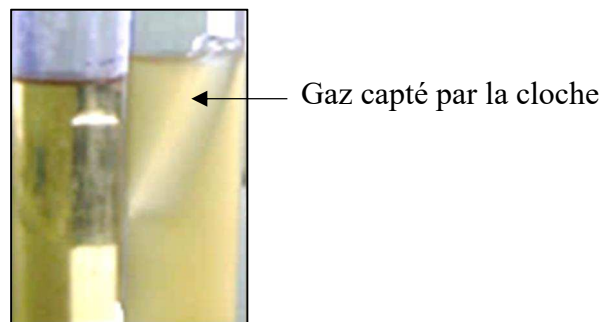


Figure 18. Production du gaz à partir du glucose de la souche CM9

b- Hydrolyse de l'arginine

Toutes les souches isolées métabolisent le lactose en produisant de l'acide lactique, ce dernier va diminuer le pH en changeant la couleur de l'indicateur de pH du pourpre au jaune, mais elles sont incapables d'hydrolyser l'arginine contenu dans le milieu M16 BCP (Fig. 19).

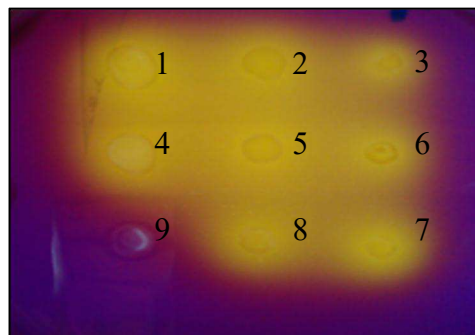


Figure 19. Incapacité des souches à hydrolyser l'arginine sur milieu M16BCP. 1, CM9 ; 2, CM30 ; 3, CM70 ; 4, SM34 ; 5, SM73 ; 6, GM2 ; 7, GM4 ; 8, F9 et 9, témoin non ensemencé.

L'ensemble des résultats précédents montre la possibilité d'appartenance des isolats aux genres de *Leuconostoc* ou *Weissella*.

c- Croissance à différentes températures

Les souches isolées ont été testées à différentes températures : 4 °C, 15 °C, 37 °C et 45 °C. Aucune croissance a été observée à 4 °C et à 45 °C. Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau 5. Les tests ont été répétés plus que trois fois.

d- Tolérance à la salinité et à l'acidité

La croissance des souches a été testée sur milieu MRS à différentes concentrations de NaCl (3% et 6,5%) et à différents pH (4,8 et 6,5). Les résultats, représentés dans le Tableau 5, indiquent que toutes les souches supportent le pH 4,8 et 6,5. En revanche, seulement 7 souches (CM6, CM11, CM57, GM5, GM7, GM9 et SM33), ne résistent à une concentration de NaCl de 3%. Aucune souche n'a pu pousser à une concentration de 6,5% de NaCl. Les tests ont été répétés plus que trois fois.

e- Utilisation des carbohydrates

Le test des sucres a été effectué en utilisant les tubes à hémolyses et la plaque Elisa, on a testé la capacité de fermenter douze sucres par vingt-huit souches isolées (Fig. 20). Toutes les souches sont incapables de fermenter le mannitol avec l'observation d'une variété dans l'utilisation des autres sucres. Les résultats obtenus sont représentés sur le Tableau 6.

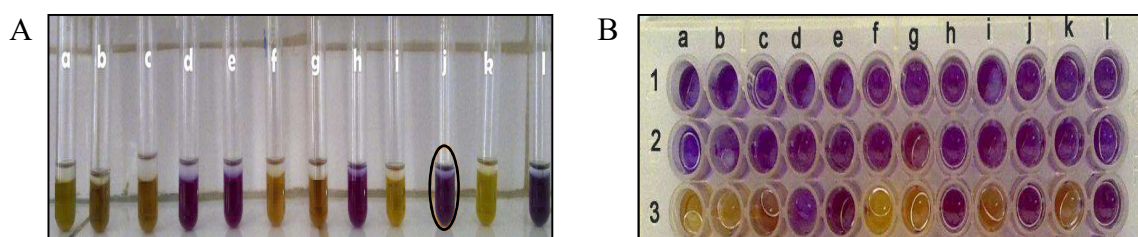


Figure 20. Profil fermentaire de la souche CM9 effectué en utilisant (A) des tubes (B) une plaque d'Elisa (1, témoin milieu MRS BCP ; 2, témoin MRS BCP + sucre ; 3, souche CM9 ; a, glucose ; b, lactose ; c, saccharose ; d, rhamnose ; e, esculine ; f, galactose ; g, maltose ; h, mannitol ; i, xylose ; j, arabinose ; k, fructose ; l, sorbitol).

Tableau 5. Évaluation de la résistance aux contraintes thermiques, osmotiques et acides de quelques souches isolées à partir des différents écosystèmes

Ecosystèmes	Souches	4 °C	15 °C	37 °C	45 °C	NaCl 3%	NaCl 6,5%	pH 4,8	pH 6,5
Lait de chamelle	CM9	-	+	+	-	+	-	+	+
	CM30	-	+	+	-	-	-	+	+
Lait de chèvre	GM2	-	+	+	-	+	-	+	+
	GM4	-	+	+	-	+	-	+	+
Lait de brebis	SM34	-	+	+	-	-	-	+	+
	SM73	-	+	+	-	-	-	+	+
Fromage bleu	F9	-	+	+	-	-	-	+	+
	F10	-	+	+	-	+	-	+	+
Ensilage	E14	-	+	+	-	+	-	+	+
Miel	M67	-	+	+	-	+	-	+	+

Tableau 6. Profil fermentaire de de quelques souches isolées à partir des différents écosystèmes

Ecosystèmes	Souches	Glu	Lac	Sac	Rha	Esc	Gal	Mal	Mnt	Xyl	Ara	Fruc	Sorb
Lait de chamelle	CM9	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
	CM30	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Lait de chèvre	GM2	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
	GM4	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Lait de brebis	SM34	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
	SM73	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
Fromage bleu	F9	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
	F10	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Ensilage	E14	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Miel	M67	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-

D'après les résultats obtenus, toutes les souches partagent le même profil fermentaire sauf pour le sucre L-arabinose et pour cela, elles ont été divisées en deux groupes selon l'utilisation du sucre arabinose (sucre N° 4 dans le classement de la galerie, voir Annexe II) : les souches Ara⁻ qui ont été classées comme *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* et les souches Ara⁺ qui ont été classées comme *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Fig. 21).



Figure 21. Profil fermentaire de la souche CM9 identifiée comme *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* sur galerie API 50 CHL

Les résultats des galeries API 50 CHL, interprétés par le programme apiweb™, ont confirmés l'appartenance des souches aux deux sous-espèces, citées précédemment, de l'espèce *Leuconostoc mesenteroides*.

f- Production des EPS

Parmi vingt-huit souches, seulement trois (CM55, CM70 et M67), présentant des colonies petites rondes lenticulaires, étaient incapables de produire les EPS à partir du saccharose avec une bonne stabilité durant le long des étapes d'isolement, de purification et d'identification. Tandis que, les vingt-cinq souches restantes ont présenté des colonies gluantes, visqueuses sur milieu MSE (Fig. 22). Ce caractère nous a permis de différencier entre les deux sous-espèces sélectionnées d'un côté et d'un autre, les autres espèces du même genre.



Figure 22. Aspect des colonies des souches de *Leuconostoc* sur milieu MSE. A, souche CM70, non productrice des EPS ; B, souche CM9 productrice des EPS

g- Production d'acétoïne

Le test phénotypique de production d'acétoïne, réalisé sur milieu Clark et Lubs, a révélé l'incapacité des souches à produire l'acétoïne contrairement à la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923, une souche productrice utilisée comme témoin (Fig. 23)

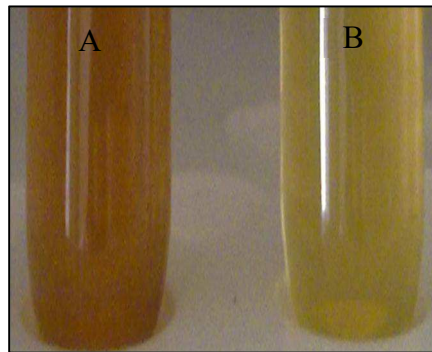


Figure 23. Incapacité de la souche CM9 à produire l'acétoïne (B) en comparaison avec la souche *S. aureus* (A). Pas de changement de couleur après l'addition de VPI et VPII

2- Identification génotypique

1-1- Identification de l'espèce par le séquençage de ADN_r 16S

L'extraction, la purification et la quantification de l'ADN_G ont été réalisées suivant le protocole mentionné auparavant, Un exemple de résultat d'extraction d'ADN_G est présenté dans la Fig. 24, où on peut constater clairement le profil d'ADN débarrassé des ARN après traitement à l'ARNase et des protéines après plusieurs traitements au phénol-chloroforme.

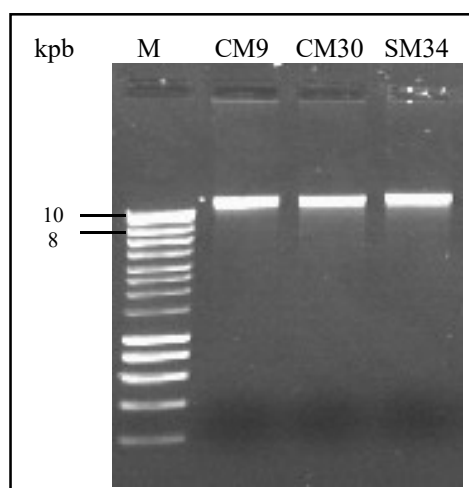


Figure 24. Analyse de l'ADN_G des souches indiquées sur gel d'agarose à 0,8%. M, marqueur de taille SmartLadder.

L'amplification du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) par les amorces 16SF et 16SR a détecté un amplicon d'une taille proche de 1,5 kpb (Fig. 25)

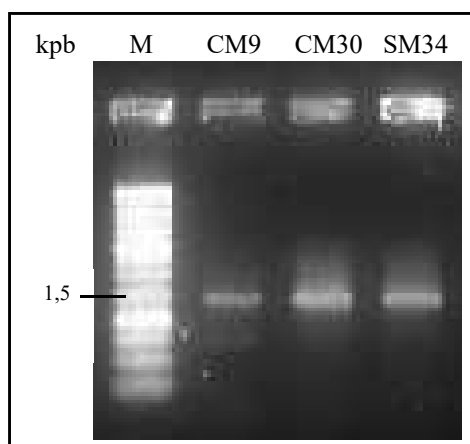


Figure 25. Analyse du produit de PCR du gène codant l'ARN 16S des souches indiquées sur gel d'agarose à 0,8%. M, marqueur de taille SmartLadder.

La séquence partielle des gènes codant pour l'ARNr 16S a été comparée avec la base de données GenBank du National Center for Biotechnology (NCBI, États-Unis). Le pourcentage de similarité de séquence avec 99% des espèces correspondantes a confirmé l'appartenance des vingt-huit souches isolées de différents écosystèmes au genre *Leuconostoc* en s'identifiant à l'espèce *mesenteroides*.

Les séquences des souches sélectionnées pour une étude approfondie des EPS ont été déposées dans GenBank (Tableau 7)

Tableau 7. Identification des souches sélectionnées

Code de la souche	Identification	Numéro d'accesion
CM9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KY083048
CM30	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KY082929
CM70	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KY780576
SM34	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KY083047

Le multi-alignement, établi avec le programme ClustalV, a démontré que les vingt-huit séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des souches isolées sont identiques (voir annexe I). A cet effet, d'autre séquence des souches cataloguées du même genre, *L. lactis* KCTC 3528 (AB023968), de la même espèce *L. mesenteroides* RTF10 (KJ161304), ainsi que la séquence de *Lb. sakei* MN1 CECT 8329 (KJ161303) utilisée comme séquence du groupe extérieur (Outgroup) ont été obtenues à partir de la banque de données (GeneBank) et ajoutées lors de

l'alignement pour les employer comme séquences guides. Par la suite, l'arbre phylogénétique (Fig. 26) a été créée afin d'établir une comparaison fiable et confirmer l'appartenance des souches.

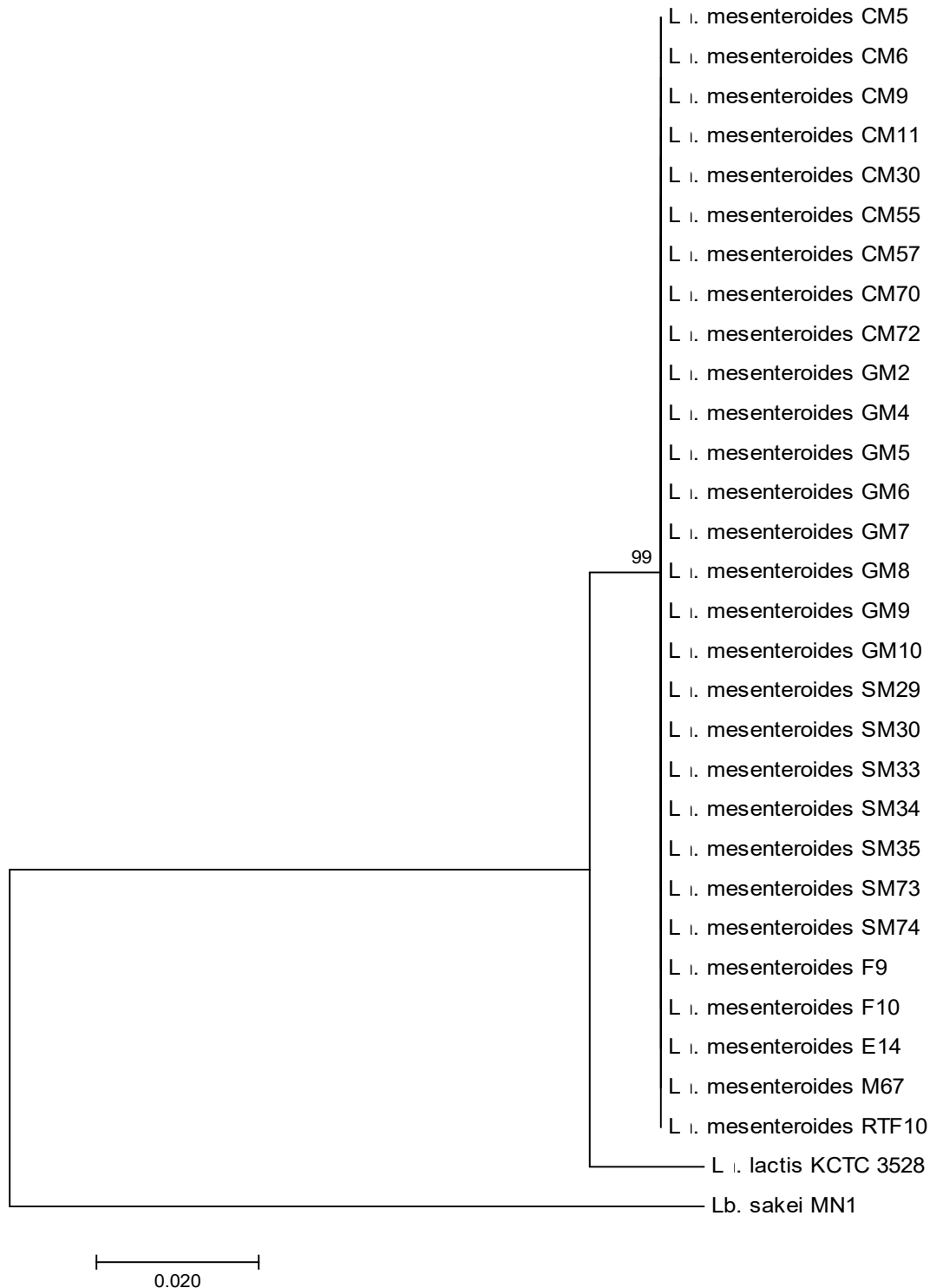


Figure 26. Arbre phylogénétique des souches du gène codant pour l'ARNr 16S des souches en utilisant la méthode Neighbor-Joining.

2-1- Identification de la sous-espèce

Afin de compléter l'identification et classer les souches selon leurs sous-espèces, Une PCR a été lancée selon le protocole décrit précédemment (Matériel et méthodes) en ayant utilisé les amorces spécifiques LmmF/LmmR de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. L'analyse du gel d'agarose a révélé que dix-sept souches parmi vingt-huit ayant eu une bande avec une taille comprise entre 0.8 et 1 kpb (Fig. 27).

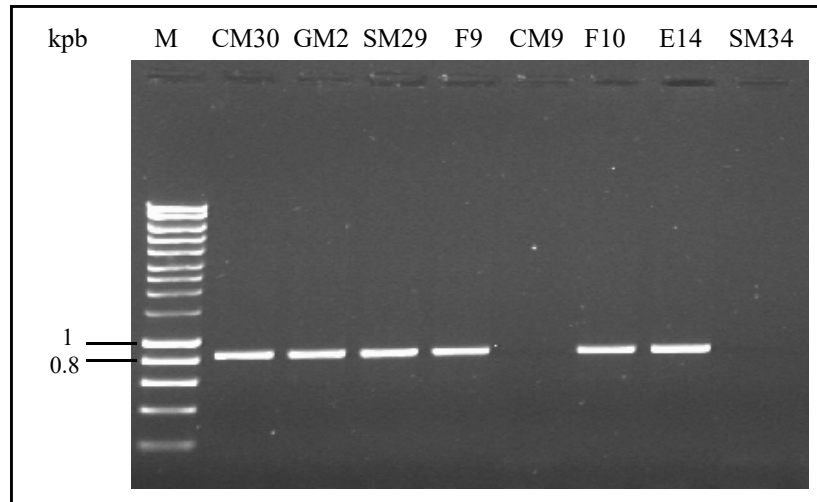


Figure 27. Analyse du produit de PCR du gène spécifique de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* des souches indiquées sur gel d'agarose à 1%. M, marqueur de taille SmartLadder.

Selon les résultats obtenus, les souches possédant l'amplicon s'identifient à *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Le Tableau 8 récapitule les résultats globaux d'identification phénotypique, basée sur l'ensemble des résultats des tests physiologiques, biochimiques et le profil fermentaire et génotypique, représenté par (i) le séquençage du gène ADNr 16S, la partie la plus fréquemment utilisée pour la taxonomie bactérienne et (ii) l'emploi des séquences spécifiques de l'espèce *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, la plus dominante parmi les espèces du genre *Leuconostoc*, ce qui confirme et renforce nos analyses phénotypiques.

Tableau 8. Résumé de l'identification phénotypique et génotypique des souches de *Leuconostoc* isolées à partir de différents écosystèmes

Ecosystème	Souche	Identification phénotypique	ARNr 16S	LmmF/LmmR
Lait de chamelle	CM5	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
	CM6	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
	CM9	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>dextranicum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	---
	CM11	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
	CM30	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
	CM55	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>dextranicum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	---
	CM57	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
	CM70	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>dextranicum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	---
	CM72	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
Lait de chèvre	GM2	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
	GM4	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
	GM5	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
	GM6	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
	GM7	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>dextranicum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	---
	GM8	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>dextranicum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	---
	GM9	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>dextranicum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	---
	GM10	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
Lait de brebis	SM29	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
	SM30	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
	SM33	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>dextranicum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	---
	SM34	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>dextranicum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	---
	SM35	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>dextranicum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	---
	SM73	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>dextranicum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	---
	SM74	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
Fromage Bleu	F9	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
	F10	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
Ensilage	E14	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>mesenteroides</i>
Miel	M67	<i>L. mesenteroides</i> subsp <i>dextranicum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	---

3- Activité protéolytique

L'activité protéolytique des souches a été recherchée sur gélose au lait. Après incubation, cette propriété s'est manifestée par l'apparition d'un halo clair autour des souches ensemencées en touches à la surface de la gélose.

D'après les résultats (Tableau 9), toutes les souches testées (Fig. 28) ont exprimé une activité protéolytique qui a évolué avec l'augmentation de pourcentage des protéines du lait (1%, 3% et 5%). Seule la souche isolée du miel M67 a présenté une faible activité dont le diamètre de le halo a varié entre 9 et 10 mm, par contre, les autres souches isolées des différents écosystèmes ayant eu présenté un halo avec une diamètre compris entre 13 et 21 mm.

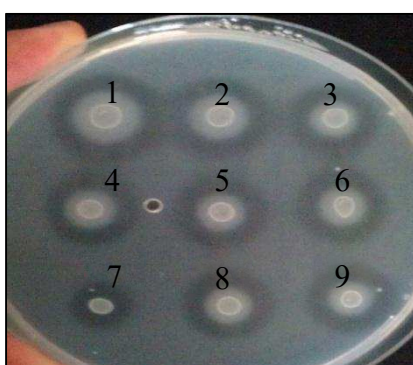


Figure 28. Activité protéolytique des souches de *L. mesenteroides* sur milieu PCA + 3% de lait écrémé. 1, CM30 ; 2, CM9 ; 3, E14 ; 4, GM2 ; 5, GM4 ; 6, SM73 ; 7, M67 ; 8, CM70 et 9, F10

Tableau 9. Activité protéolytique de certaines souches de *L. mesenteroides* isolées à partir de différents écosystèmes

Ecosystèmes	Souches	Diamètres des halos PCA + Lait (mm)		
		1%	3%	5%
Lait de chamelle	CM9	15	16	17
	CM30	16	17	17
Lait de chèvre	GM2	14	16	19
	GM4	15	16	21
Lait de brebis	SM34	12	13	16
	SM73	14	16	19
Fromage bleu	F9	13	16	18
	F10	14	14	15
Ensilage	E14	16	16	18
Miel	M67	09	09	10

4- Activité lipolytique

La mise en évidence de l'activité lipolytique chez les souches de *L. mesenteroides* a été réalisée sur milieu MRS additionné de 1%, 3% ou 5% de tween 20 et de l'huile d'olive, séparément. Après incubation, ce caractère technologique s'est manifesté par l'apparition d'un halo plus ou moins opaque autour des souches ensemencées en touches à la surface de la gélose (Fig. 29). D'après les résultats obtenus (Tableau 10), onze souches (CM5, CM6, CM9, CM55, CM72, GM5, GM8, GM10, SM35, SM73 et SM74) n'ont présenté aucun halo autour de l'ensemencement, ce qui signifie qu'elles sont dépourvues de toute activité lipolytique. Les dix-sept souches restantes, et dans le cas des trois pourcentages testés, ont pu dégrader les deux sources lipidiques (naturelle et artificielle).

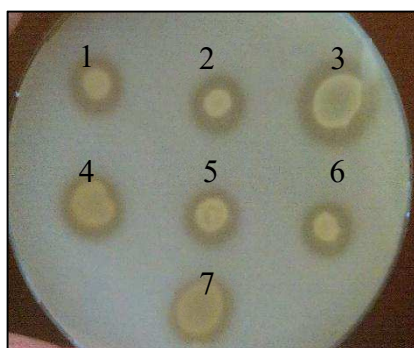


Figure 29. Mise en évidence de l'activité lipolytique des souches de *L. mesenteroides* sur milieu MRS + 3% d'huile d'olive. 1, CM30 ; 2, CM70 ; 3, E14 ; 4, GM2 ; 5, GM4 ; 6, SM34 et 7, M67.

Tableau 10. Mise en évidence de l'activité lipolytique de certaines souches de *L. mesenteroides* isolées à partir de différents écosystèmes

Ecosystèmes	Souches	Tween 20			Huile d'olive		
		1%	3%	5%	1%	3%	5%
Lait de chamelle	CM9	-	-	-	-	-	-
	CM30	+	+	+	+	+	+
Lait de chèvre	GM2	+	+	+	+	+	+
	GM4	+	+	+	+	+	+
Lait de brebis	SM34	+	+	+	+	+	+
	SM73	-	-	-	-	-	-
Fromage bleu	F9	+	+	+	+	+	+
	F10	+	+	+	+	+	+
Ensilage	E14	+	+	+	+	+	+
Miel	M67	+	+	+	+	+	+

5- Utilisation du citrate

La capacité des souches à utiliser le citrate a été testée sur milieu KMK. Après incubation, ce caractère technologique important s'est présenté par l'apparition des colonies bleues. Toutes les souches sont capables de co-métaboliser le citrate en présence de glucose, sans exception (Fig. 30).

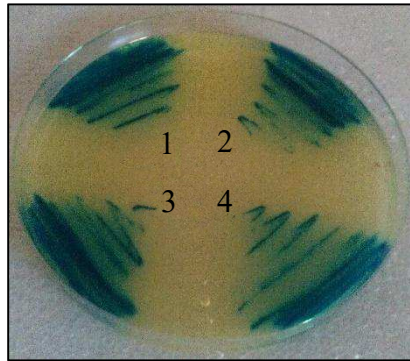


Figure 30. Utilisation de citrate par les souches de *L. mesenteroides* sur milieu KMK. 1, CM30 ; 2, SM34 ; 3, CM70 et 4, CM9.

5-1- Détection du gène *citP* partiel

Suite au résultat précédent, on a voulu détecter la présence du gène codant pour la citrate perméase CitP par l'amplification de la partie la plus conservée par PCR. Pour cela, L'ADNp des souches CM9, CM70 a été utilisé, En plus, de les ADNp des souches *W. paramesenteroides* J1 et *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* CRL 264 qui ont été employés comme un contrôle positif. L'analyse du gel d'agarose a révélé le même amplicon chez toutes les souches de taille proche de 800 pb (Fig. 31).

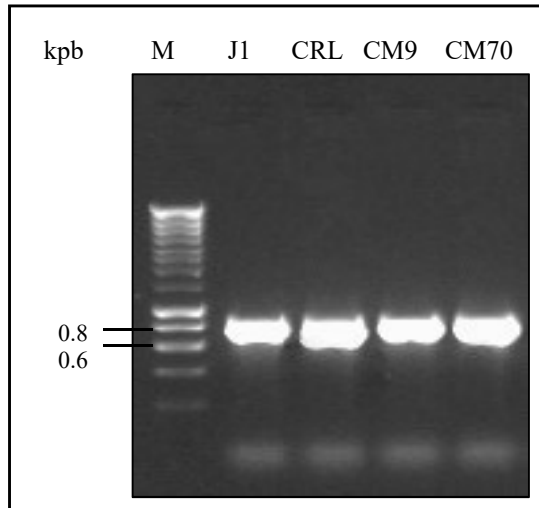


Figure 31. Analyse du produit de PCR sur gel d'agarose à 1% du gène partiel *citP* présent chez les souches *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* CM9 et CM70, *W. paramesenteroides* J1 et *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CRL 264. M, marqueur de taille SmartLadder.

6- Cinétique d'acidification en milieu lait écrémé

Pour étudier le comportement des souches sélectionnées et leur effet sur le l'acidité et la texture du lait, une cinétique d'acidification a été suivie durant 16 h et 24 h d'incubation.

La diminution du pH (Fig. 32A) et l'évolution de l'acidité dornic (Fig. 32B) des six souches, en culture pure, a commencé sans phase de latence, puisqu'on a utilisé une pré-culture dans le même milieu lait. Durant le temps d'incubation, on a remarqué qu'il y avait deux rythmes différents dans l'acidification du lait, ce qui nous a poussé à diviser les souches en deux groupes, le premier groupe (GI) rassemble les souches CM9, GM2, SM34 et F9 isolées du lait de chamelle, lait de chèvre, lait de brebis et fromage, respectivement, ayant une rapide et forte acidification, tandis que le deuxième groupe (GII) rassemble les souches E14 et M67 isolées d'ensilage et du miel, respectivement, ayant une faible et lente acidification par rapport au premier groupe. La cinétique d'acidification pour les deux groupes a commencé par un pH neutre de 6,85 à 0 h pour arriver après 24 h d'incubation à une valeur qui varie selon les souches entre $5,10 \pm 0,01$ et $5,20 \pm 0,02$ pour GI et entre $5,72 \pm 0,02$ et $5,70 \pm 0,03$ pour le GII. Toutes les souches, appartenant au GII, possédèrent la même vitesse de diminution de pH ($-0,10 \pm 0,01$ unités de pH h⁻¹), tandis que les souches E14 et M67 possédèrent une vitesse moins rapide ($-0,07 \pm 0,01$ unités de pH h⁻¹). L'évolution de l'acidité dornic a été inversement proportionnelle à la diminution du pH, ce qui est exprimé clairement dans les figures. L'acidité dornic a

commencé à 0 h par 16 °D, qui correspond à un pH neutre. Le GI a connu une acidité dornic rapide par rapport au GII, où le souche CM9 a passé, durant 8 h d'incubation, de $34 \pm 0,57$ °D à $54 \pm 0,57$ °D, par contre, la souche E14 a passé, durant la même période, de $27 \pm 0,57$ °D à 39 ± 1 °D. Une différence d'acidification mesurée par l'acidité dornic de 40% entre les deux souches a été mentionnée. La vitesse d'acidification, reflétant la quantité d'acide lactique produit exprimée par l'acidité dornic, des deux groupes a clairement variée ($2,48 \pm 0,11$ °D h⁻¹, pour le GI, contre $1,66 \pm 0,12$ °D h⁻¹, pour le GII).

La coagulation ou la formation de coagulum du lait après 24 h d'incubation a été observé seulement chez le GI et non pas chez le GII, malgré la présence de l'extrait de levure dans la composition du lait qui est connu comme un composant de stimulation de croissance, et par conséquent, d'acidification.

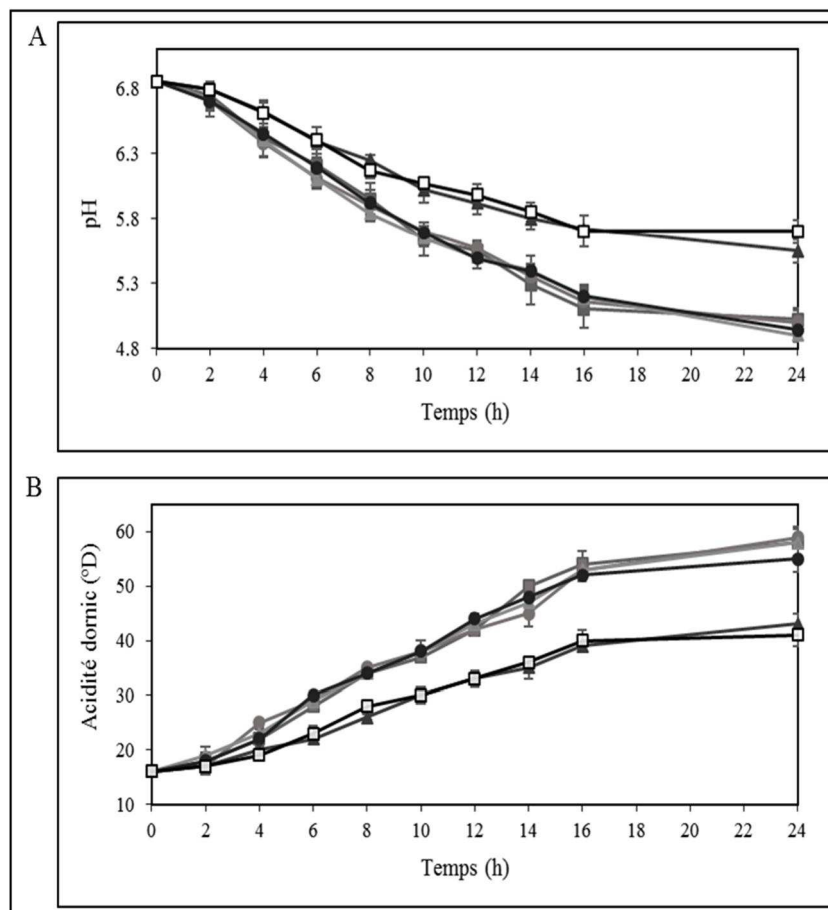


Figure 32. Cinétique d'acidification, diminution du pH (A), d'évolution de l'acidité dornic (B), des souches de *L. mesenteroides* CM9, GM2, SM34, F9, E14 et M67, dans milieu lait écrémé avec 0.3% d'extrait de levure. (■) CM9, (●) GM2, (▲) SM34, (●) F9, (▲) E14, (□) M67.

7- Profil protéique

L'identification des souches de *Leuconostoc* a été confirmée par une analyse électrophorétique des protéines solubles en conditions dénaturantes (gel de polyacrylamide-SDS). Cette méthode a été réalisée aussi pour établir une comparaison entre les souches isolées de différents écosystèmes en permettant d'examiner les « empreintes protéiques » de bactéries cultivées dans les mêmes conditions de croissance (Fig. 33).

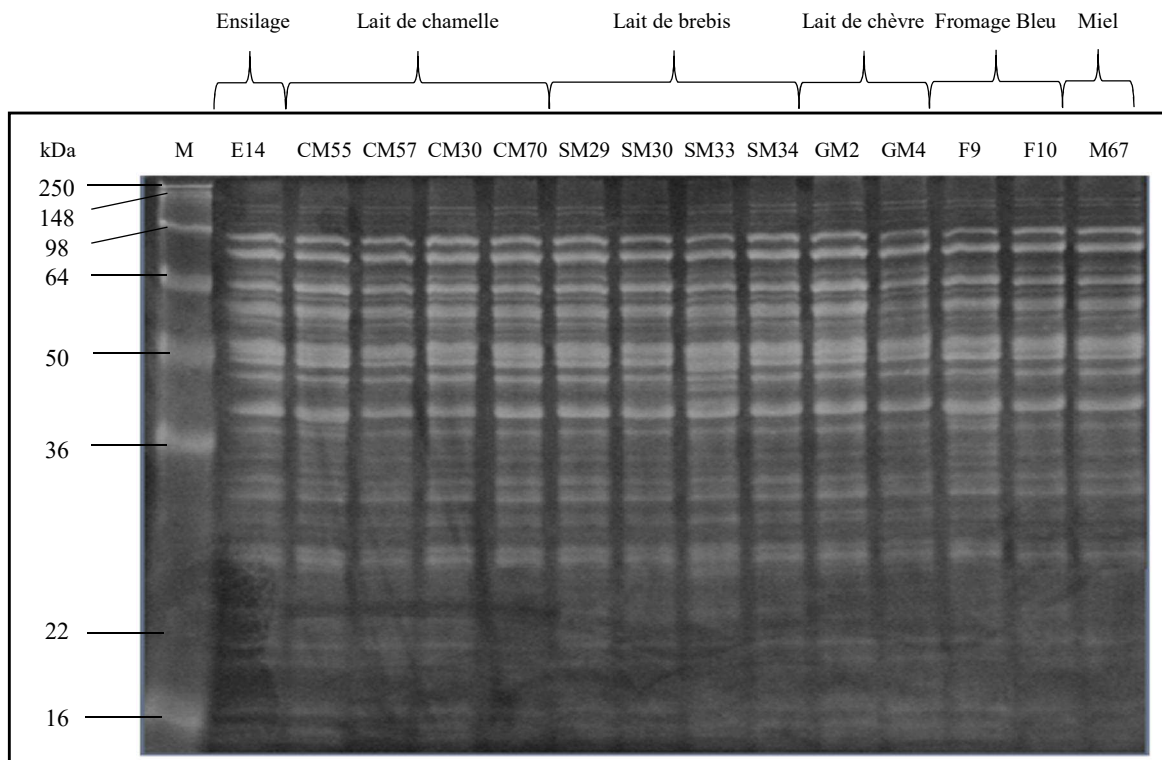


Figure 33. Analyse des protéines totales par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS des souches de *L. mesenteroides* isolées de différents écosystèmes. M : marquer de taille See Blue.

A l'œil nu, on peut constater que toutes les souches presque présentent le même profil protéique. Pour cela, le profil des pics obtenus de toutes les souches, après traitement au programme ImageJ, ont été mises en comparaison pour sélectionner les pics en communs (Fig. 34).

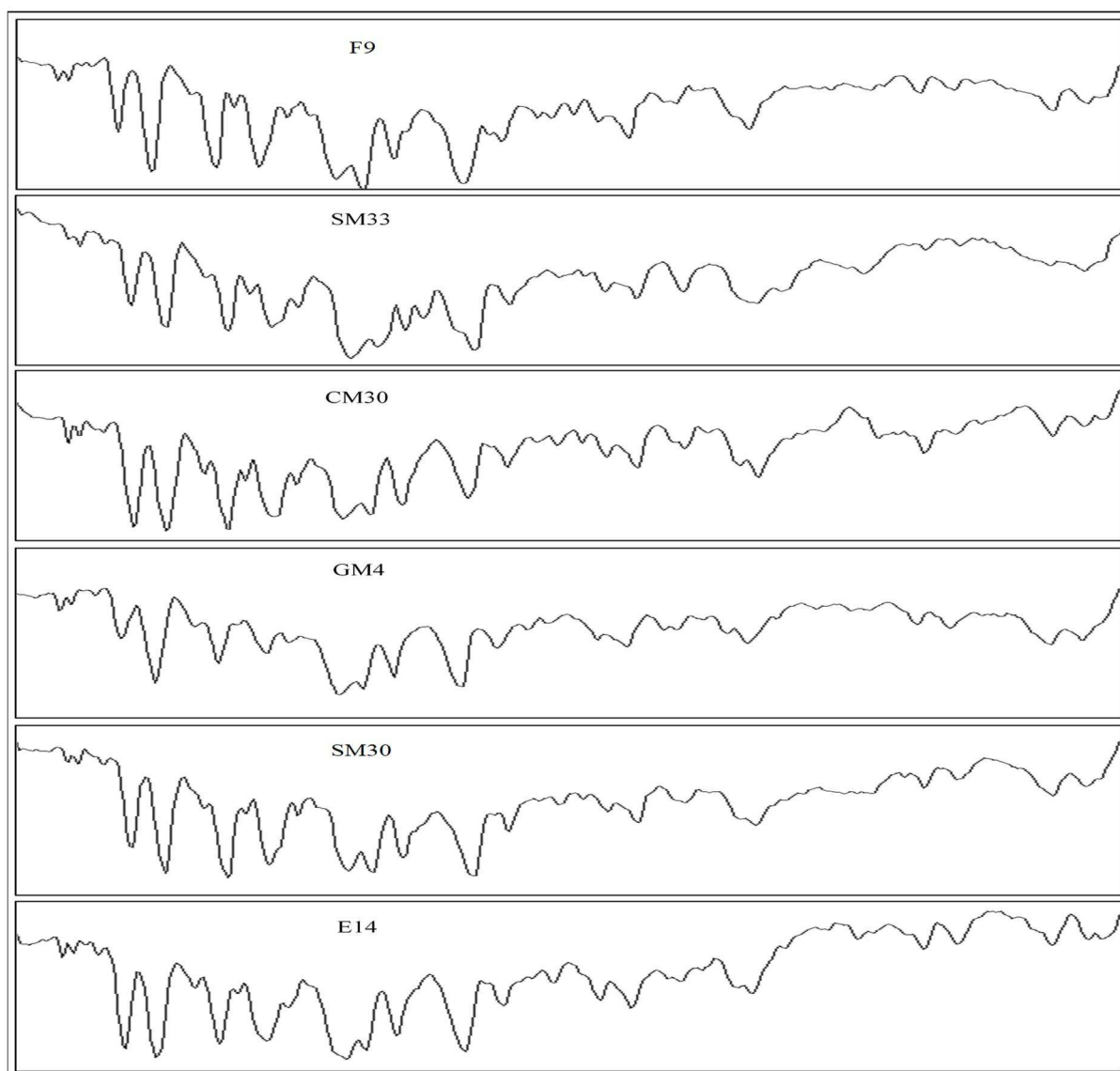


Figure 34. Analyse des protéines totales des souches de *L. mesenteroides* précédemment fractionnées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS. Les chromatogrammes obtenus en balayant les rues du gel de polyacrylamide-SDS avec le programme ImageJ.

D'après les pics obtenus des différentes pistes de migrations, le nombre des protéines totales détectées sur un gel de séparation de 12% est compris entre 29 et 33 bandes, qui devraient correspondre plus au moins le nombre de polypeptides, seule la souche SM33 ayant présenté le nombre le plus élevé avec 34 bandes protéiques. La bande dissemblable, la plus visible, avec une intensité élevée sur le gel d'agarose, est celle de la souche SM33, a une taille moléculaire comprise entre 36 et 56 kDa, selon le marqueur de taille See Blue. Cette bande représente 1,12% par rapport à l'aire qu'elle occupe vis-à-vis l'ensemble des protéines totales. Une différence globale de 14,70% a été observée entre les quatorze souches testées.

Pour classer les souches en groupes selon leur ressemblance, le coefficient de similitude entre chaque deux souches a été calculé (Tableau 11).

Tableau 11. Matrice des coefficients de similarité (%) entre chaque deux souches de *L. mesenteroides*

	E14	CM55	CM57	CM30	CM70	SM29	SM30	SM33	SM34	GM2	GM4	F9	F10	M67
E14	100.00													
CM55	93.94	100.00												
CM57	96.97	96.88	100.00											
CM30	93.94	100.00	96.88	100.00										
CM70	93.94	100.00	96.88	100.00	100.00									
SM29	100.00	93.94	96.97	93.94	93.94	100.00								
SM30	100.00	93.94	96.97	93.94	93.94	97.06	100.00							
SM33	94.29	88.57	94.12	91.18	91.18	96.97	97.06	100.00						
SM34	96.97	96.88	100.00	96.88	96.88	96.97	96.97	94.12	100.00					
GM2	96.97	96.88	100.00	96.88	96.88	96.97	96.97	94.12	100.00	100.00				
GM4	96.97	96.88	100.00	96.88	96.88	96.97	96.97	94.12	100.00	100.00	100.00			
F9	87.88	96.88	90.63	93.55	93.55	87.88	87.88	85.29	90.63	90.63	90.63	100.00		
F10	87.88	93.55	90.63	93.55	93.55	87.88	87.88	85.29	90.63	90.63	90.63	100.00	100.00	
M67	87.88	93.55	90.63	93.55	93.55	87.88	87.88	85.29	90.63	90.63	90.63	100.00	100.00	100.00

D'après les résultats obtenus, le taux de similitude, globalement, varie entre 85,29% et 100%. Le plus bas coefficient a été remarqué chez les souches F9, F10 (isolées du fromage bleu) et M67 (isolée du miel), ce qui suggère qu'elles appartiennent au même groupe, et cela, vis-à-vis leur ressemblance avec la souche SM33.

Pour bien distinguer les groupes apparentés, la matrice de similitude a été représentée sous forme d'un phénogramme (Fig. 35), comme déjà décrits dans la partie du matériel et méthodes. Selon le phénogramme tracé, on peut distinguer six clusters regroupant quatorze souches, seules SM30 et SM33 formant un cluster avec une seule souche.

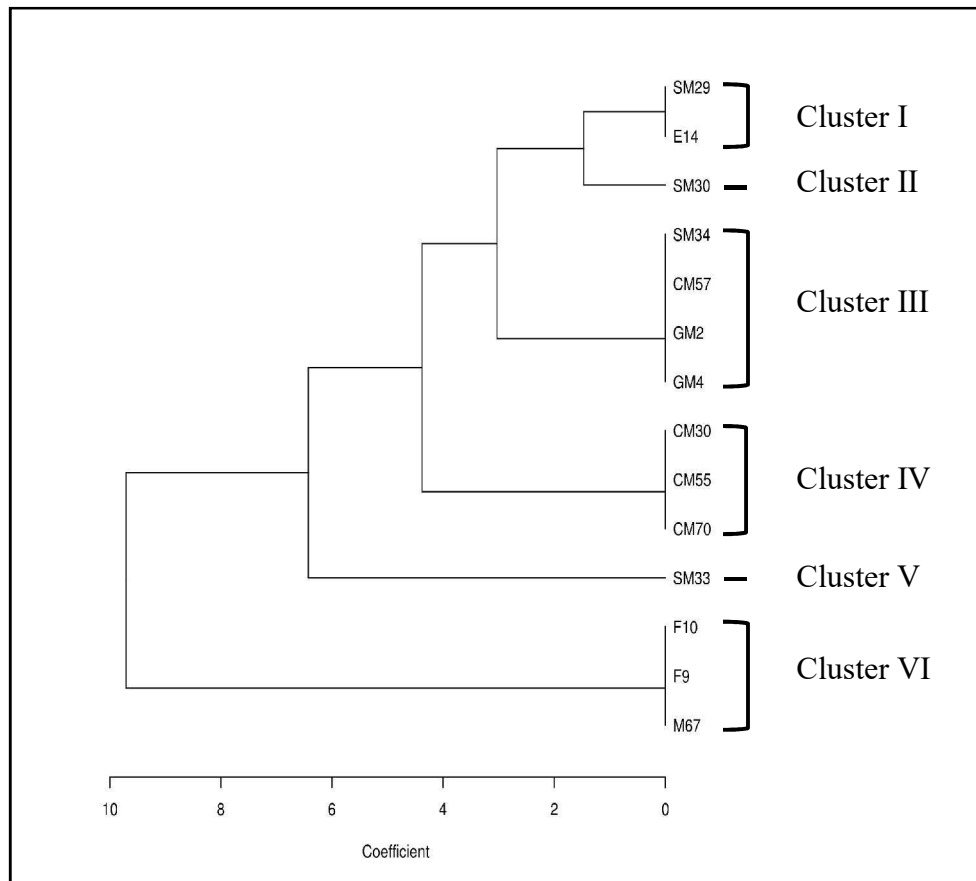


Figure 35. Phénogramme de similitude entre les souches de *L. mesenteroides* isolées de différents écosystèmes. Le phénogramme a été calculé par la méthode UPGMA.

8- Quantification des EPS

Les EPS ont été produits en cultivant les vingt-huit souches de *L. mesenteroides* jusqu'à une $A_{600\text{nm}}$ de 1,5, sur milieu CDM supplémenté avec 2% du saccharose, précipités avec l'éthanol. Le culot, obtenu après centrifugation, a été séché à l'air libre puis resuspendu dans de l'eau pure. La quantification des EPS par la méthode de dosage des sucres totaux, en utilisant la courbe d'étalonnage de glucose, a révélé des niveaux de production qui varient entre $0,55 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1}$ et $3,52 \pm 0,18 \text{ g L}^{-1}$ des souches E14 (isolée d'ensilage) et CM30 (isolée du lait de chamelle), respectivement (Fig. 36).

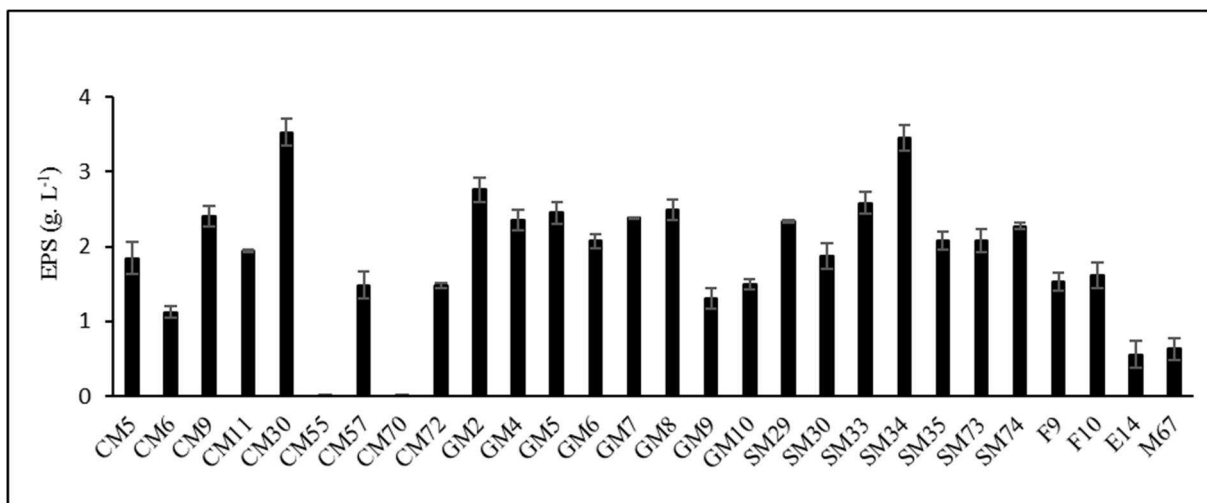


Figure 36. Production des EPS des souches de *L. mesenteroides* sur milieu CDMS

Parmi vingt-huit souches, seulement deux souches, CM55 et CM70, isolées du lait de chamelle, présentant des niveaux de production presque nulles. Pour cela, elles ont été classées, préliminairement, comme des souches non productrices des EPS. Aucune relation n'a été détectée avec l'habitat des souches.

Les résultats obtenus nous a permis de classer les souches en quatre groupes, selon leur quantité des EPS produit en présence de 2% de saccharose :

- (i) Espèces fortement productrices pour celles présentant des niveaux de production entre 2 et 3 g L⁻¹ : CM9, CM11, CM30, GM2, GM4, GM5, GM6, GM7, GM8, SM29, SM33, SM34, SM35, SM73, SM74.
- (ii) Espèces moyennement productrices pour celles présentant des niveaux de production entre 1 et 2 g L⁻¹ : CM5, CM6, CM57, CM72, GM9, GM10, SM30, F9, F10.
- (iii) Espèces faiblement productrices pour celles présentant des niveaux de production entre 0,5 et 1 g L⁻¹ : E14 et M67.
- (iv) Espèces non productrices pour celles présentant des niveaux quasi nuls : CM55 et CM70.

9- Détection des EPS au niveau macroscopique

Pour commencer l'étude approfondie de la production des EPS chez les leuconostocs. Une pré-sélection des souches CM9, CM30, SM34 et CM70 a été faite en se basant sur plusieurs critères : les caractères phénotypiques, les aptitudes technologiques, la quantité des EPS produite et la forme et la taille des colonies formées, en présence du saccharose.

Ces souches ont été employées pour suivre l'évolution et la stabilité de la production des EPS pendant 120 h d'incubation successive à 30 °C. Pour cela, une observation phénotypique vis-à-vis le niveau de production, la forme et la taille des colonies formées sur milieux gélosés MRSS et MRSG contenant 2% du saccharose et 2% du glucose, respectivement, a été réalisée. Deux souches de la collection *L. mesenteroides* RTF10 et *Lb. sakei* MN1 ont été additionnées comme une référence.

Selon les résultats obtenus, des niveaux de production variables avec des formes différentes ont été détectés seulement sur MRSS, tandis qu'aucune production n'a été remarquée sur MRSG. Ce qui nous a permis de classer les souches en groupes, en présence du saccharose (Fig. 37) :

- (i) Les souches fortement productrices, possédant des colonies grandes, gélatineuses d'aspect liquide, qui varie en fonction du temps où elles deviennent plus en plus semi-liquide jusqu'à la formation des tapis des colonies presque lysées : CM30 et SM34, ainsi que la souche de contrôle RTF10.
- (ii) Les souches d'une production moyenne à basse, possédant des colonies gluantes de forme moyenne et d'aspect rigide liées fortement à l'agar en gardant le même aspect durant tout le temps d'incubation : CM9 et MN1.
- (iii) La souche non productrice, possédant le même aspect observé en présence du glucose avec des colonies blanches, petites et lenticulaires : CM70, cette bactérie est utilisée comme une référence d'une bactérie non productrice.

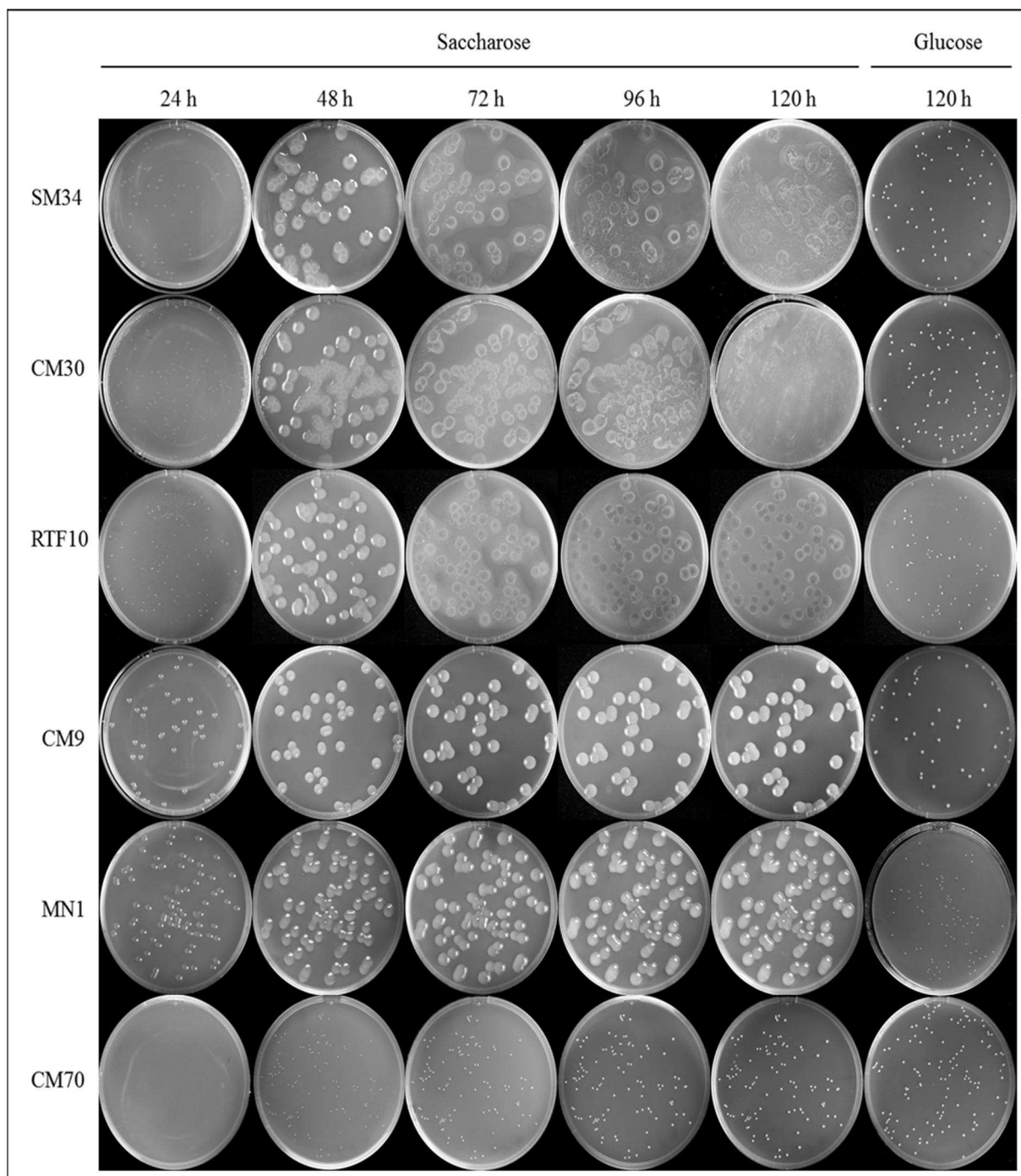


Figure 37. Détection et évolution de la production des EPS par BL cultivées en plaques en présence du saccharose.

10- Localisation des EPS au niveau microscopique

Pour localiser les EPS produits par, on a passé à la microscopie électronique. Chaque colonie muqueuse des souches CM9, CM30 et SM34 a été utilisée comme matrice pour être directement analysée par MET et cela, pour minimiser la perte de dextrane attachée aux bactéries lors de la manipulation de l'échantillon. Les observations (Fig. 38) et autres résultats non représentés ont révélé que les molécules d'EPS synthétisées entourent les cellules bactériennes les cellules bactériennes, bien que la plupart des molécules n'étaient pas attachées à elles. Les EPS apparaissent sous forme d'un réseau complexe des molécules unies l'une à l'autre. Aucune détection de production des EPS n'a été enregistrée en présence de glucose, comme seule source de carbone.

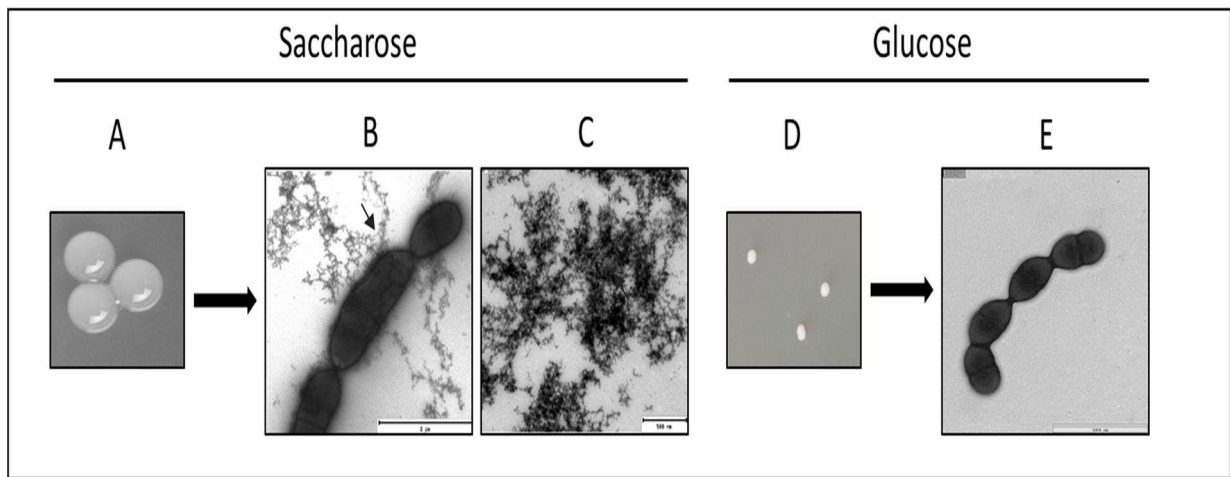


Figure 38. Localisation au niveau cellulaire de la production des EPS des souches *L. mesenteroides* CM9 par MET. (A) et (D) croissance sur milieu solide MRSS et MRSG, respectivement, (B) et (E) analyse à partir d'une colonie bactérienne appropriée, (C) analyse directe des EPS CM9. La flèche indique la présence des EPS

11- Métabolisme du saccharose, production du glucose, fructose, mannitol, l'acide lactique et des EPS durant un suivi de la cinétique de croissance

Une fois déterminé que les souches de *L. mesenteroides* CM9, CM30, SM34 et RTF10 ainsi que la souches *Lb. sakei* MN1 produisent des EPS en présence de saccharose comme source de carbone, les niveaux de production ont été analysés au cours de la croissance en milieu liquide CDM supplémenté avec 0,8% de saccharose à 30 °C pendant 24 h. Des échantillons ont été prélevés à des moments différents, à partir du temps 0 (0 h), pour : (i) réaliser un suivi de croissance des cultures par A_{600nm} ; (ii) suivi la cinétique d'acidification par la mesure du pH extracellulaire, (iii) quantifier la production d'EPS par la méthode phénol-sulfurique et (iv)

suivre le taux de consommation du saccharose et la production de ces métabolites : glucose, fructose, mannitol et lactate.

En ce qui concerne l'impact sur la croissance bactérienne due à l'utilisation du saccharose en tant qu'une source de carbone, toutes les bactéries ont eu une croissance plus faible que leur croissance habituelle en milieu MRS, les souches de *L. mesenteroides* SM34 et CM30 ont eu des taux de plus au moins similaires ($0,39 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ et $0,43 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$, avec un temps de génération (T_D) de 152 min et 140 min, respectivement). La souche *L. mesenteroides* CM9 était la souche la plus rapide ($\mu=0,66 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, $T_D=91 \text{ min}$), parmi les souches de *Leuconostoc* étudiées, en la comparant la souche RTF10 ($\mu=0,56 \pm 0,09 \text{ h}^{-1}$, $T_D=106 \text{ min}$). Par contre, la souche *L. mesenteroides* CM70 était la seule souche ayant possédé la plus basse vitesse vis-à-vis le développement sur ce milieu défini dont son taux de croissance était de $0,29 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ avec un temps de génération de 205 min, il lui a fallu plus que le double du temps de génération de la souche CM9 pour la division cellulaire. La souche *Lb. sakei* MN1 a présenté le temps de génération les plus bas avec 87 min avec un taux de $0,69 \text{ h}^{-1}$ (Nácher-Vázquez et al., 2017).

Les résultats, présentés dans la Fig. 39 et 40, ont montré aussi que les souches de *L. mesenteroides* ainsi que la souche *Lb. sakei* synthétisent les EPS en phase exponentielle de croissance en parallèle avec une augmentation de $A_{600\text{nm}}$ et une diminution du pH. La souche SM34 présente le même profil que la souche CM30. Les niveaux de production de EPS obtenus au milieu de la phase logarithmique (après 8 h d'incubation) de chaque souche ont été de $0,97 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$ lorsque *L. mesenteroides* SM34 atteint $A_{600\text{nm}} = 1,48 \pm 0,01$, $0,90 \pm 0,13 \text{ g L}^{-1}$ lorsque *L. mesenteroides* CM30 atteint $A_{600\text{nm}} = 1,35 \pm 0,03$ versus $0,31 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ lorsque *L. mesenteroides* CM9 atteint $A_{600\text{nm}} = 3,68 \pm 0,07$, tandis que les deux souches de références produisent $1,03 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$ avec $A_{600\text{nm}} = 2,45 \pm 0,07$ et $1,56 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$ avec $A_{600\text{nm}} = 5,10 \pm 0,06$ pour *L. mesenteroides* RTF10 et *Lb. sakei* MN1 (Nácher-Vázquez et al., 2017), respectivement. Aucune production des EPS n'a été détectée chez *L. mesenteroides* CM70 durant toute la courbe de croissance, ce qui confirme leur incapacité de produire ces polymères, en présence de saccharose. Cette souche a poussé lentement sur le milieu CDMS, en la comparant avec les autres.

Les taux des EPS, dans le milieu extracellulaire a augmenté après 24 h de croissance, soit $3,14 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$, $2,15 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$, $1,47 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$, $1,04 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$ et $2,23 \pm 0,13 \text{ g L}^{-1}$ pour les souches de *L. mesenteroides* SM34, CM30, CM9, RTF10 et *Lb. sakei* MN1, respectivement.

En outre, les résultats de l'étude métabolique déterminée des six souches, qui a eu lieu en parallèle à la production d'EPS et tout le long de la croissance : la concentration de saccharose (source de carbone), le glucose et le fructose (métabolites primaires de saccharose) le mannitol

(métabolite secondaire de saccharose) et de l'acide lactique (produit de la glycolyse), basé sur les surnageants de culture en utilisant une chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Les niveaux de la consommation du saccharose et ses produits (glucose, fructose, mannitol et acide lactique) pendant la production des EPS ont montré que les souches de *L. mesenteroides* CM9, RTF10 et *Lb. sakei* MN1 ont consommé totalement le saccharose ajouté au milieu (entre 23 mM et 26 mM) après 6 h, 7 h et 8 h d'incubation, respectivement. Les souches *L. mesenteroides* SM34 et CM30 ont présenté un profil presque identique dont elles ont métabolisé totalement ce substrat principal après 10 h d'incubation. Tandis que la souche *L. mesenteroides* CM70, non productrice des EPS, a été classée comme la souche la plus lente au saccharose, avec 17 h de consommation.

Selon les profils obtenus (Fig. 39 et 40), on peut voir clairement que toutes les souches ont accumulé le fructose durant leur consommation du saccharose. L'atteinte du sommet de cette accumulation est liée de façon étroite avec la consommation totale de substrat principal. Les taux extracellulaires maximaux d'accumulation des souches de *L. mesenteroides* SM34, CM30, CM9, RTF10 sont de $11,62 \pm 0,51$ mM, $11,05 \pm 0,17$ mM, $12,00 \pm 0,10$ mM, $14,78 \pm 0,55$ mM. La souche *Lb. sakei* MN1 a présenté une valeur inférieure par rapport aux souches précédentes, elle a pu accumulé $7,93 \pm 0,56$ mM après 7 h d'incubation. La souche CM70 a obtenu la valeur la moins faible, de $3,09 \pm 0,05$ mM et cela après 17 h de consommation totale du saccharose.

Le glucose, le produit primaire du métabolisme du saccharose, a été consommé de façon contenue, sans aucune accumulation, qui est le cas de toutes les souches sauf la souche *L. mesenteroides* RTF10, qui l'a accumulé presque la moitié du taux du fructose. Après 6 h d'incubation face au saccharose, le glucose a atteint $6,64 \pm 0,49$ mM qui coïncidait avec l'accumulation maximale du fructose et l'utilisation totale du saccharose. Les niveaux d'accumulation du fructose et du glucose (RTF10) ont diminué par la suite, cet abaissement étant plus lent dans les cultures *Lb. sakei* MN1 et *L. mesenteroides* CM70. Lorsque le saccharose extracellulaire a atteint un niveau indétectable, les souches ont commencé à utiliser les produits primaires, précédemment accumulés, dans le milieu de culture. Les niveaux d'acide lactique produits par *Lb. sakei* MN1 et *L. mesenteroides* CM70 (Fig. 40) étaient supérieurs à ceux synthétisés par les autres souches qui ont présenté le même profil vis-à-vis l'acidification du milieu. Les résultats ont montré que la cinétique d'acidification des souches étudiées était proportionnelle à la courbe de croissance (A_{600nm}).

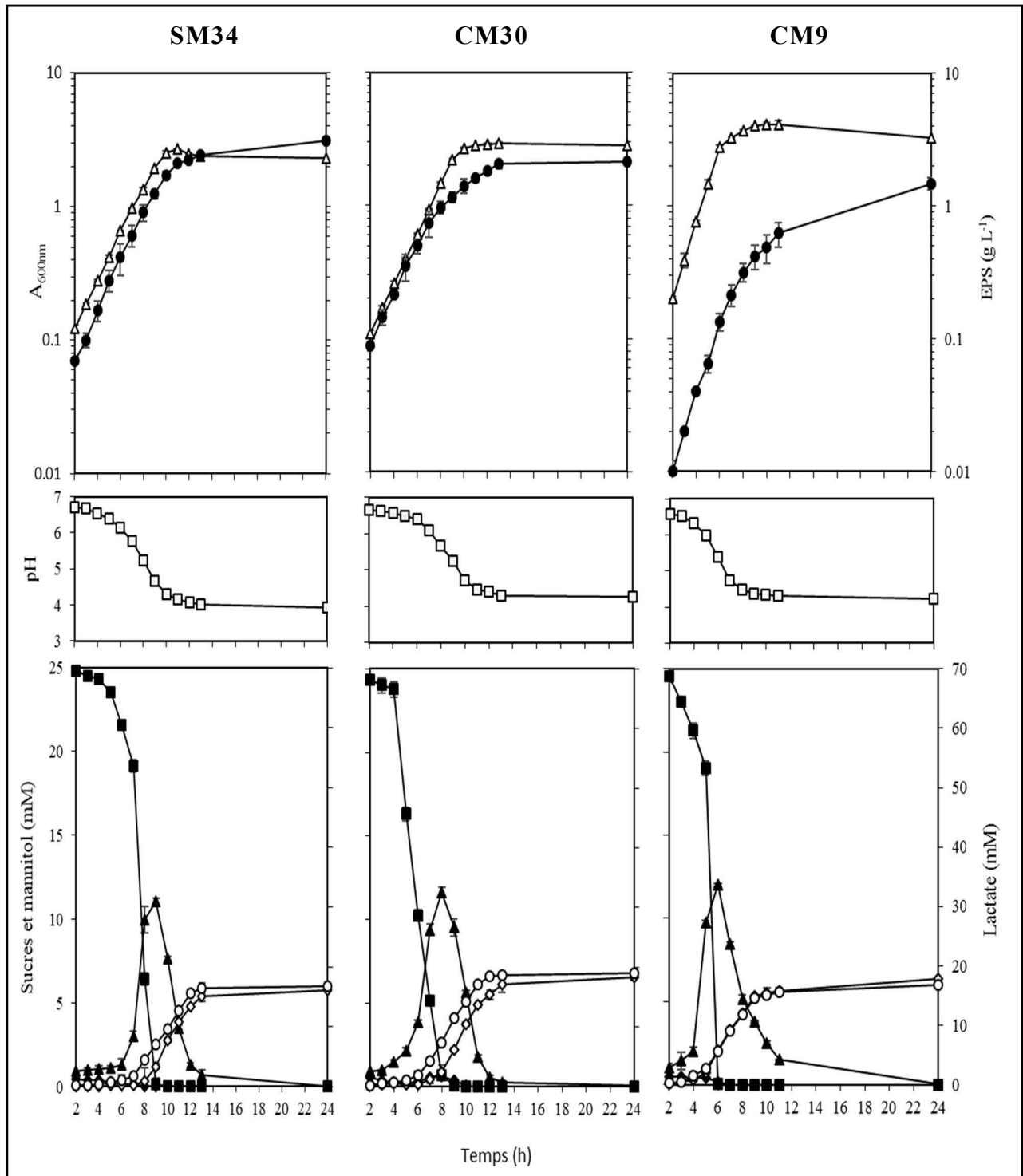


Figure 39. Analyse du métabolisme du saccharose et de la production EPS des souches de *L. mesenteroides* SM34, CM30 et CM9. A_{600nm} (▲), EPS (●), pH (□), saccharose (■), glucose (○), fructose (▲), mannitol (◇) et acide lactique (●).

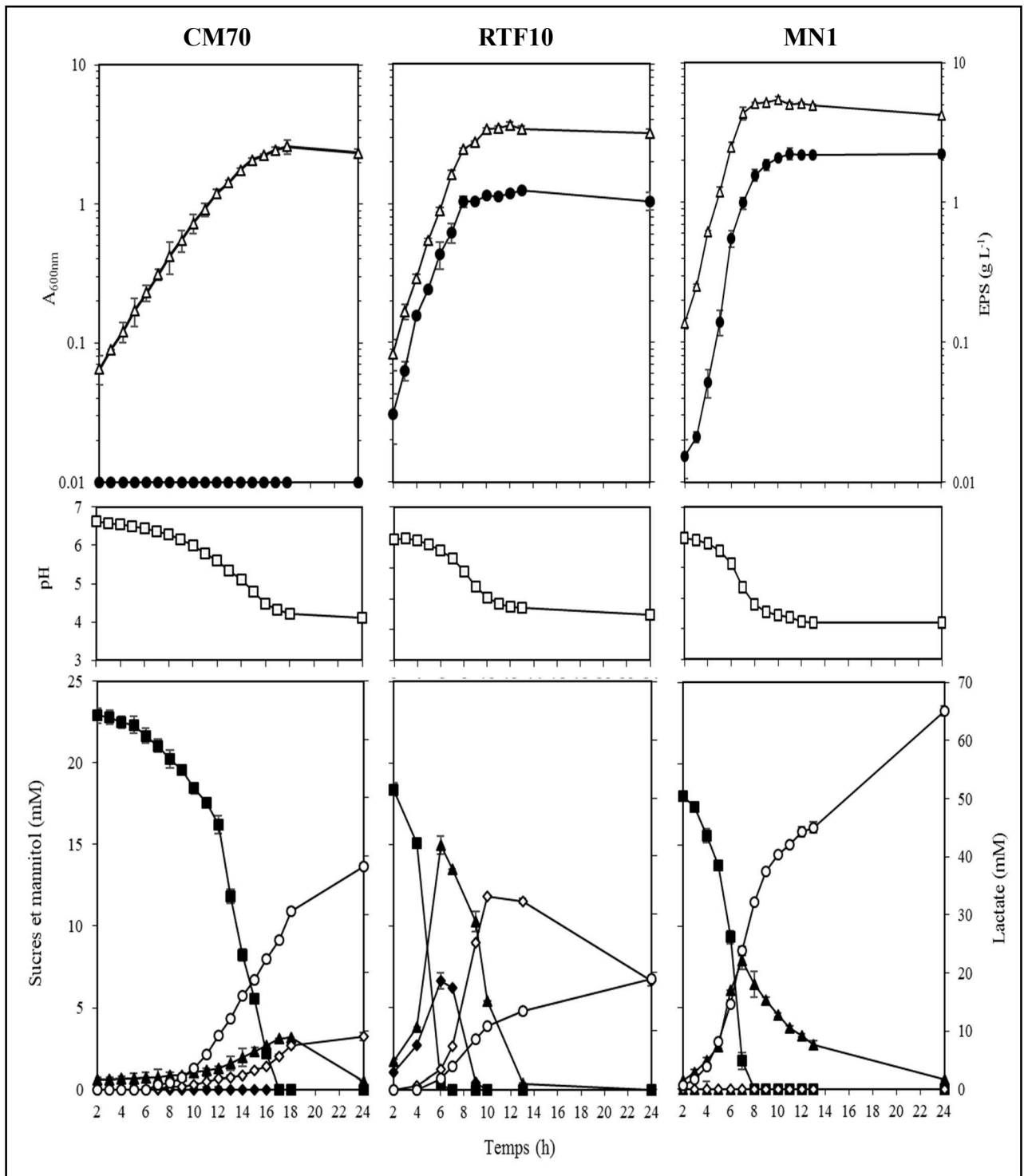


Figure 40. Analyse du métabolisme du saccharose et de la production EPS des souches de *L. mesenteroides* CM70, RTF10 et *Lb. sakei* MN1. A_{600nm} (▲), EPS (●), pH (□), saccharose (■), glucose (◆), fructose (▲), mannitol (◇) et acide lactique (●).

Les niveaux atteints, après 24 h d'incubation, étaient supérieurs dans le cas des *Lb. sakei* MN1 ($65,05 \pm 0,83$ mM), suivi par la souche non productrice des EPS, *L. mesenteroides* CM70 avec $38,25 \pm 0,53$ mM, tandis que les autres souches ont montré des valeurs qui varient entre 16,78 mM jusqu'à 19,01 mM.

Le quatrième composant suivi aussi est le mannitol qui a été détecté durant tout le long du métabolisme du saccharose. Ce polyol a été détecté seulement chez les souches de *L. mesenteroides* qui l'ont produit que tardivement. Cette production semble être proportionnelle à la consommation du fructose déjà accumulé. Les taux de production des souches *L. mesenteroides* SM34, CM30, CM9, CM70 et RTF10, après 24 h d'incubation, sont de $6,57 \pm 0,23$ mM, $5,74 \pm 0,78$ mM, $6,36 \pm 0,04$ mM, $3,25 \pm 0,23$ mM et $6,62 \pm 0,30$ mM, respectivement. La production du mannitol a été presque croissante, sauf chez la souche RTF10 où le taux a connu une diminution remarquable avec 43% de réduction après 24 h. La souche *Lb. sakei* MN1 est dépourvue de cette production. Ces résultats confirment que, chez les leuconostocs, le fructose est converti directement en mannitol dans une réaction catalysée par la 2-déshydrogénase de mannitol, qui est, théoriquement, produite par induction chez les souches de *Leuconostoc sp.*

Ces résultats confirment que *Lb. sakei* MN1 comme bactérie lactique de hétérofermentaire facultative métabolise les hexoses par la voie de la glycolyse (rendement de deux molécules de lactate à partir d'une molécule de glucose), tandis que les souches de *L. mesenteroides* qui possèdent un métabolisme hétérofermentaire strict, utilise la voie de la 6-phosphogluconate pour fermenter les hexoses (rendement d'une molécule de lactate à partir d'une molécule de glucose consommée).

12- Analyse et caractérisation structurale des EPS

Les souches sélectionnées CM9, CM30 et SM34, productrices des EPS avec différents aspects et différents niveaux de synthèse ont été employées afin d'effectuer une caractérisation physico-chimique des EPS dans des milieux de culture contenant du saccharose comme source de carbone et d'évaluer davantage son bioactivité un degré pureté assez élevé.

12-1- Isolement et purification des EPS

Sur la base des résultats précédents et, afin d'obtenir un rendement plus élevé des EPS, les surnageants, obtenus après 24 h d'incubation, des souches cultivées sur milieu CDMS ont été utilisés. Pour éviter la contamination causée par la lyse cellulaire ou par composants du milieu, le protocole décrit dans la partie antérieure et des méthodes a été standardisé. L'évaluation de

la concentration des EPS, des protéines, d'ADN et d'ARN dans les surnageants des cultures ont révélé qui a une variabilité entre les souches vis-à-vis leur production de EPS, les souches CM30 et SM34 s'est caractérisée par une forte production ($2.15 \pm 0.15 \text{ g L}^{-1}$ et $3.14 \pm 0.06 \text{ g L}^{-1}$, respectivement), tandis que les souches CM9 a présenté une production moins faible ($1.47 \pm 0.08 \text{ g L}^{-1}$), cette dernière est classée comme médiane par rapport à la production de la souche de la même espèce *L. mesenteroides* RTF10 ($1.25 \pm 0.11 \text{ g L}^{-1}$) et *Lb. sakei* MN1 ($1.72 \pm 0.12 \text{ g L}^{-1}$), isolées d'un autre écosystème. Il a été remarqué que les niveaux de production sont élevés, malgré l'utilisation d'un milieu chimiquement défini et une concentration basse de saccharose, ce qui indique qu'on peut obtenir des niveaux plus élevés en employant des concentrations plus élevées de saccharose.

Toutes les extractions des EPS ont présenté un niveau élevé de pureté variant entre 95,05 % pour la souche SM34 et 97,85 % pour la souche CM30 (Tableau 12). Des contaminations par des protéines avec une moyenne de 3,53 % et d'ADN avec une moyenne de 0,16 %, ont été détectées. La présence d'ARN a été détectée seulement dans le surnageant des souches CM9 et CM30 avec un très faible pourcentage (0.03 % et 0.01 %, respectivement). Pour élever le grade de pureté, les EPS présents dans les surnageants de culture ont été précipités avec un volume d'éthanol (v/v) pendant 24 h à 4 °C, dialysés et lyophilisés. Après cette purification partielle, encore une fois, les niveaux de pureté ont été mesurés en quantifiant le pourcentage des EPS récupéré, face aux contaminants présents. Une augmentation du degré de pureté de EPS d'environ 99 % a été remarquée chez toutes les souches et cela est du à la réduction significative de la concentration de protéines et des acides nucléiques (Tableau 12).

Tableau 12. Analyse du degré de pureté des EPS isolées de souches sélectionnées

Echantillons Souches	^b Surnageant				^b Après précipitation et dialyse				^c Après fractionnement chromatographique			
	EPS (%)	Protéine (%)	ADN (%)	ARN (%)	EPS (%)	Protéine (%)	ADN (%)	ARN (%)	EPS (%)	Protéine (%)	ADN (%)	ARN (%)
CM9	96,49	3,21	0,24	0,03	99,90	0,10	ND	ND	100	ND	ND	ND
SM34	95,05	4,73	0,21	ND	99,86	0,14	ND	ND	100	ND	ND	ND
CM30	97,85	1,99	0,13	0,01	99,86	0,14	ND	ND	100	ND	ND	ND
RTF10	95,85	4,03	0,12	ND	99,88	0,12	ND	ND	100	ND	ND	ND
MN1	96,15	3,70	0,14	ND	99,79	0,21	ND	ND	100	ND	ND	ND

^a100% correspond à la concentration totale des biomolécules détectées (EPS, protéines, ADN et ARN) dans chaque échantillon.

^bLes concentrations des protéines, d'ADN et d'ARN ont été mesurées directement à partir des surnageants. La concentration des EPS a été déterminée après précipitation avec éthanol.

^cLa concentration des biomolécules a été déterminée à partir des préparations à une concentration de 2 mg mL⁻¹ des EPS lyophilisés dissous dans l'eau pure.

ND indique les niveaux au-dessous de la limite de détection correspondant à 1 µg mL⁻¹ de protéines, 0,5 µg mL⁻¹ d'ADN et 20 ng mL⁻¹ d'ARN.

De petites traces des contaminants restant ont été éliminés par chromatographie d'exclusion en utilisant une colonne préparative de Sepharose CL 6B équilibrée avec de l'eau ultrapure (Tableau 12).

Une récupération de 100% de l'EPS a été atteinte pour toutes les souches. Les préparations des EPS ont montré un seul pic majoritaire d'éluion, très définie et détectée par la méthode de dosage des sucres totaux. Les fractions représentées par les pics dans la Fig. 41 ont été recueillies comme un seul échantillon dénommant EPS CM9, EPS CM30 et EPS SM34 appartenant aux souches *L. mesenteoides* CM9, CM30 et SM34, respectivement, pour être utilisés dans des études ultérieures.

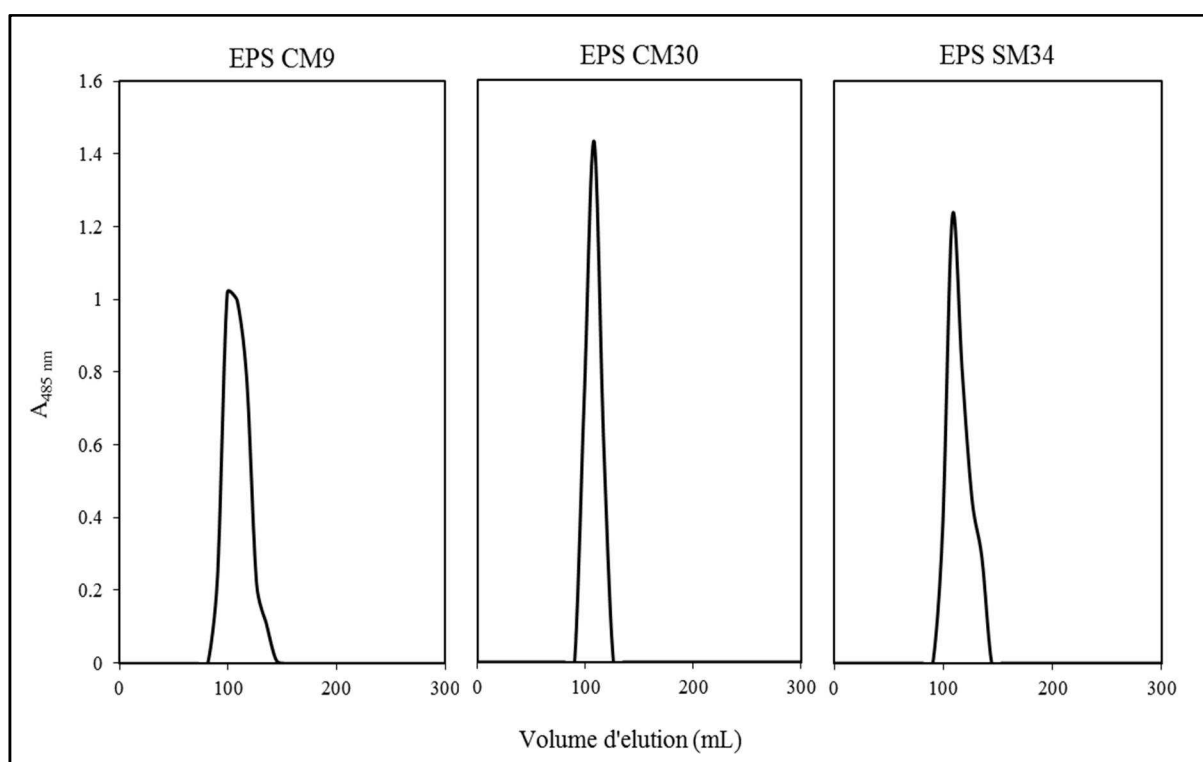


Figure 41. Chromatographie d'exclusion des EPS CM9, EPS CM30 et EPS SM34.

12-2- Caractérisation structurale des EPS

Une fois purifié, la caractérisation structurale des EPS a été réalisée par : (i) l'analyse de la composition de monosaccharides ; (ii) l'analyse de la méthylation et (iii) la détermination du spectre infrarouge.

L'identification des monosaccharides présents dans les EPS a été réalisée par une hydrolyse acide. Les monosaccharides obtenus ont été transformés en leurs acétates d'alditols correspondants, dérivés volatils, qui ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse. Tous les EPS possèdent le même type de chromatogramme (Fig. 42 montre l'analyse de EPS-

CM9), indiquant que le glucose est le seul constituant qui compose tous les EPS des souches de *L. mesenteroides* et la souche de *Lb. sakei* MN1.

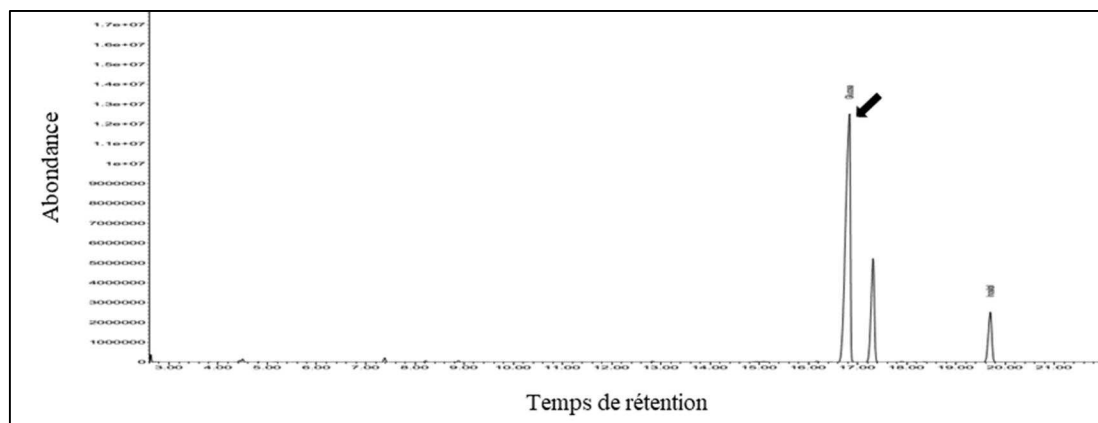


Figure 42. Composition de monosaccharides de EPS CM9. Inositol a été utilisé comme standard interne. La flèche indique le pique de glucose.

Les spectres d'infrarouge des préparations des EPS CM9, EPS CM30 et EPS SM34 présentaient le même profil (Fig. 43), avec des bandes d'absorption spécifiques comprises entre $847\text{-}849\text{ cm}^{-1}$ et $913\text{-}917\text{ cm}^{-1}$ qui correspondent aux α -anomères. Le même résultat a été observé chez EPS de *L. mesenteroides* RTF10 (EPS RTF10) et EPS *Lb. sakei* MN1 (EPS MN1).

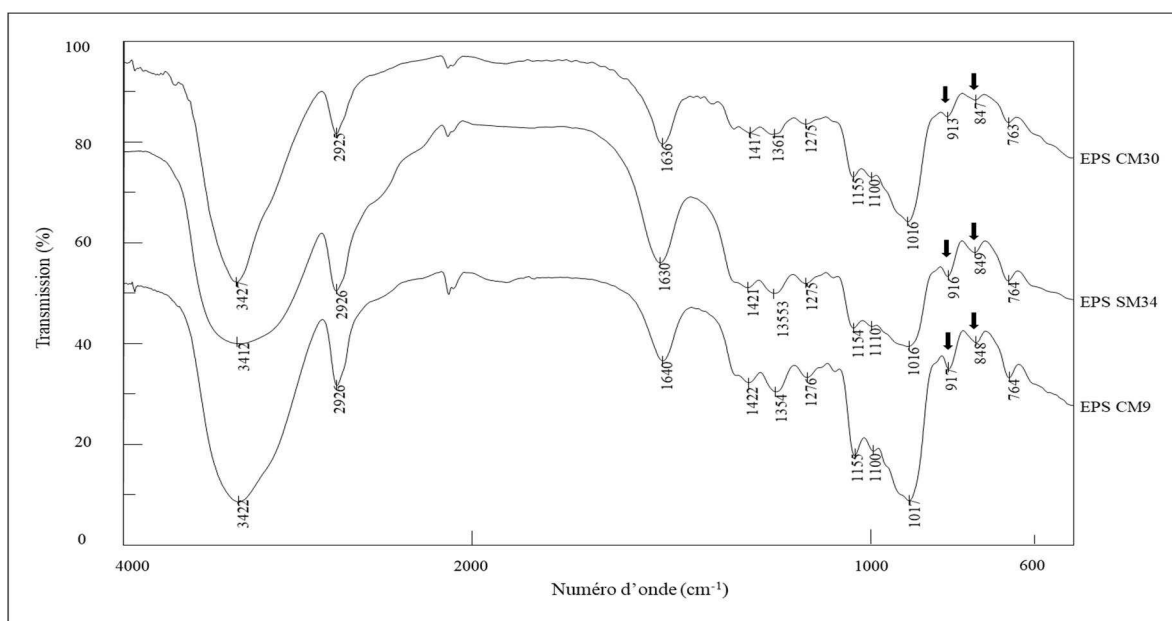


Figure 43. Spectre infrarouge des EPS CM9, EPS CM30 et EPS SM34. Les flèches indiquent les ondes spécifiques aux α -anomères

L'analyse de méthylation a été réalisée par GC-MS pour déterminer le type de liaison entre les molécules de glucose. Les résultats obtenus ont révélé que les trois EPS aient possédé une

chaîne principale d'unités glucopyranose avec une liaison de α -(1,6) (entre 85,3% et 89,4%) et partiellement ramifiés en position *O*-3 par une seule unité α -glucopyranose (entre 8,5 % et 10,3%) (Fig. 44 et Tableau 13). Par ailleurs, L'analyse de l'EPS MN1 a montré 97% de liaisons α -(1,6) avec 3% des substitutions en position *O*-3, tandis que, l'EPS RTF10 a montré 91% liaisons α -(1,6) à 9% substitutions à la position *O*-3 (Nacher-Vazquez et al., 2015).

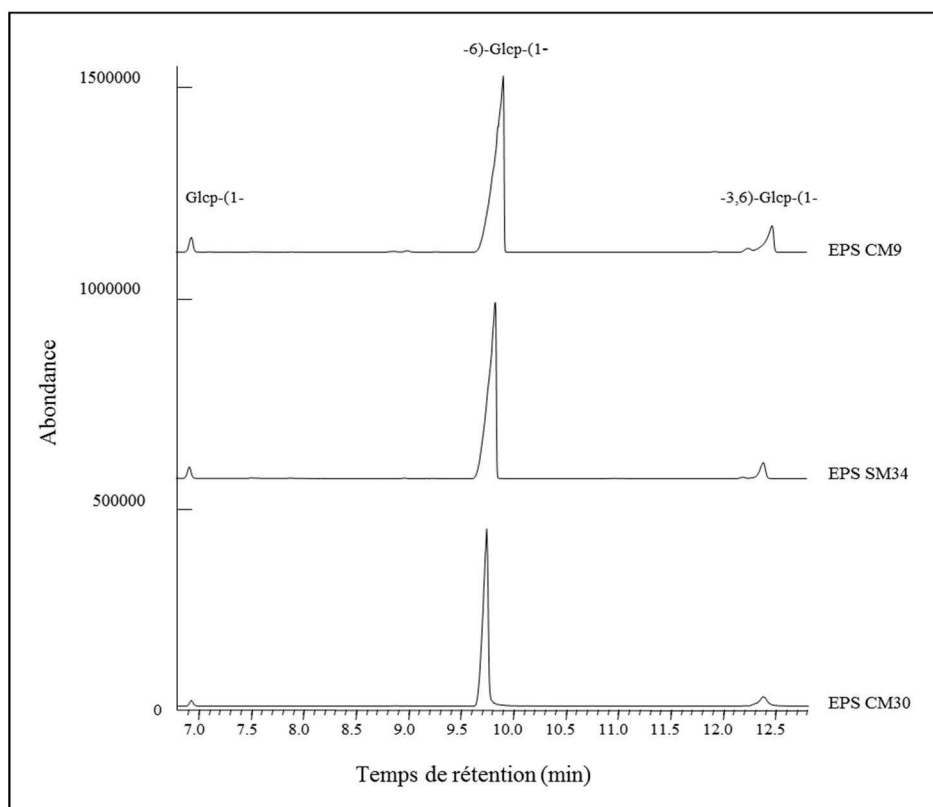


Figure 44. Types des liaisons des EPS analysés par méthylation. Glcp : glucopyranose

Tableau 13. Analyse de méthylation des EPS des *L. mesenteroides* CM9, CM30 et SM34

Type de Liaison (%)	Glcp-(1-	-6)-Glc-(1-	-3,6)-Glc-(1-
EPS CM9	3	86,7	10,3
EPS CM30	2	89,4	8,5
EPS SM34	2,7	85,3	11,9

Par conséquent, en raison de l'existence d'un seul monosaccharide, à la position des liaisons entre les molécules de glucose et selon les résultats des spectres infrarouge qui ont montré des bandes caractéristiques d' α -anomères, on peut conclure que les EPS étudiés dans ce présent travail sont HoPS, type dextrane, dont sa structure est représentée dans la Fig. 45.

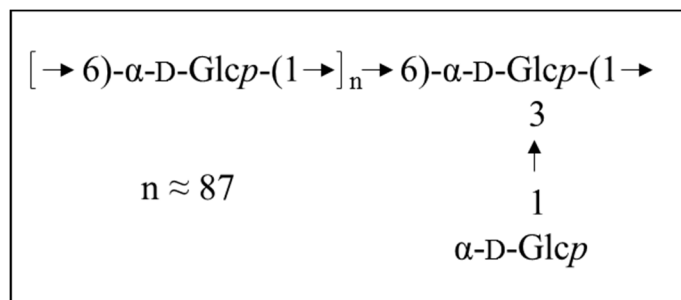


Figure 45. Structure générale des EPS analysés.

Pour déterminer la masse moléculaire exacte des EPS commerciaux (T10, T50, T2000) et naturels, la SEC-MALLS a été utilisée selon le protocole décrits dans la partie précédente en se basant sur le détecteur de diffusion de lumière à angle 90 ° et un autre d'indice de réfraction. Tous les EPS employés ont un seul pique (majoritaire, dans le cas de quelque EPS commerciaux) ce qui reflète leur pureté. La masse moléculaire des dextrans produits par les souches isolées de *L. mesenteroides* (EPS CM9, EPS CM30, EPS SM34 et EPS RTF10) ainsi que la souche *Lb. sakei* (EPS MN1) ont une masse moléculaire très élevée, comprise entre 1×10^8 Da et 5×10^8 Da (Tableau 14 et Fig. 47), en la comparant avec les dextrans commerciaux, principalement T2000. Ce dernier avait possédé une masse de 2×10^6 Da, par contre l'analyse par SEC-MALLS a déterminé une masse moléculaire de $1,33 \times 10^6$ Da (équivalent à T1000 et non pas à T2000). Les dextrans T10 et T40 ont confirmé leur masse moléculaire déjà décrite de $1,22 \times 10^4$ Da et $3,98 \times 10^4$ Da, respectivement. Cette détermination avait une importance remarquable vis-à-vis l'étude de leur bioactivité dans des études postérieures.

Tableau 14. Masse moléculaire des dextrans analysés

Source	Dextrans	Masse moléculaire (Da)
Commerciaux	T10	$1,22 \times 10^4$
	T40	$3,98 \times 10^4$
	T2000	$1,33 \times 10^6$
<i>Lb. sakei</i> MN1	EPS MN1	$1,7 \times 10^8$
<i>L. mesenteroides</i> SM34	EPS SM34	$2,1 \times 10^8$
<i>L. mesenteroides</i> CM9	EPS CM9	$2,3 \times 10^8$
<i>L. mesenteroides</i> CM30	EPS CM30	$3,9 \times 10^8$
<i>L. mesenteroides</i> RTF10	EPS RTF10	$4,4 \times 10^8$

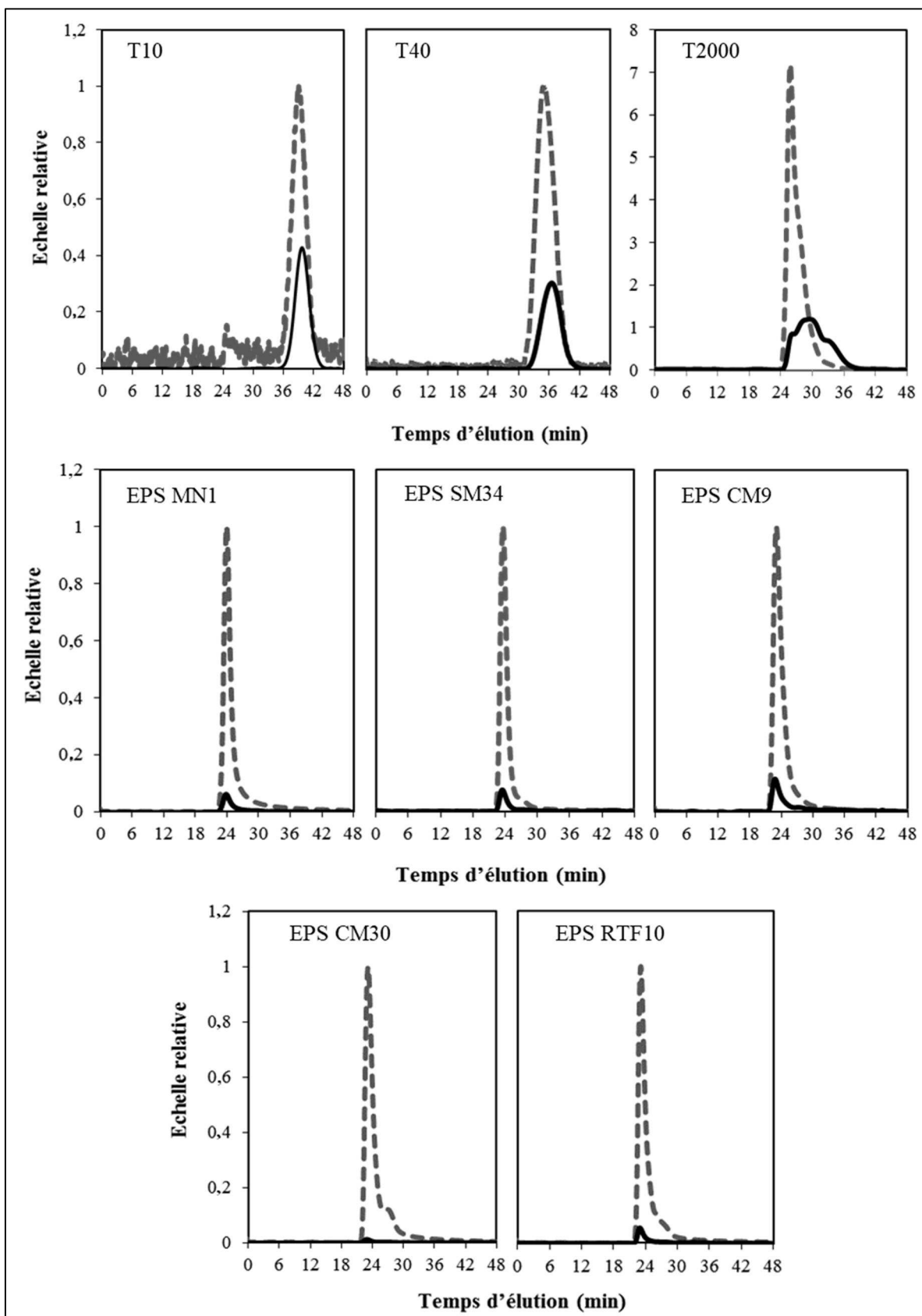


Figure 46. Chromatogrammes des masses moléculaires des EPS commerciaux et naturels analysés par SEC-MALLS. Symboles : ligne pointillée, détecteur de diffusion de lumière à angle 90° et ligne continue, détecteur de l'indice de réfraction.

13- Gene *dsr* : Détection et séquençage.

Une fois déterminé que les EPS produits par les souches de *L. mesenteroides* CM9, CM30, SM34 sont des HoPS type dextrane, et sachant que ce dernier est synthétisé par un type de glucane-saccharase communément appelée la dextrane-saccharase, une étude a été réalisée pour déterminer la base génétique de cette production.

13-1- Profil plasmidique

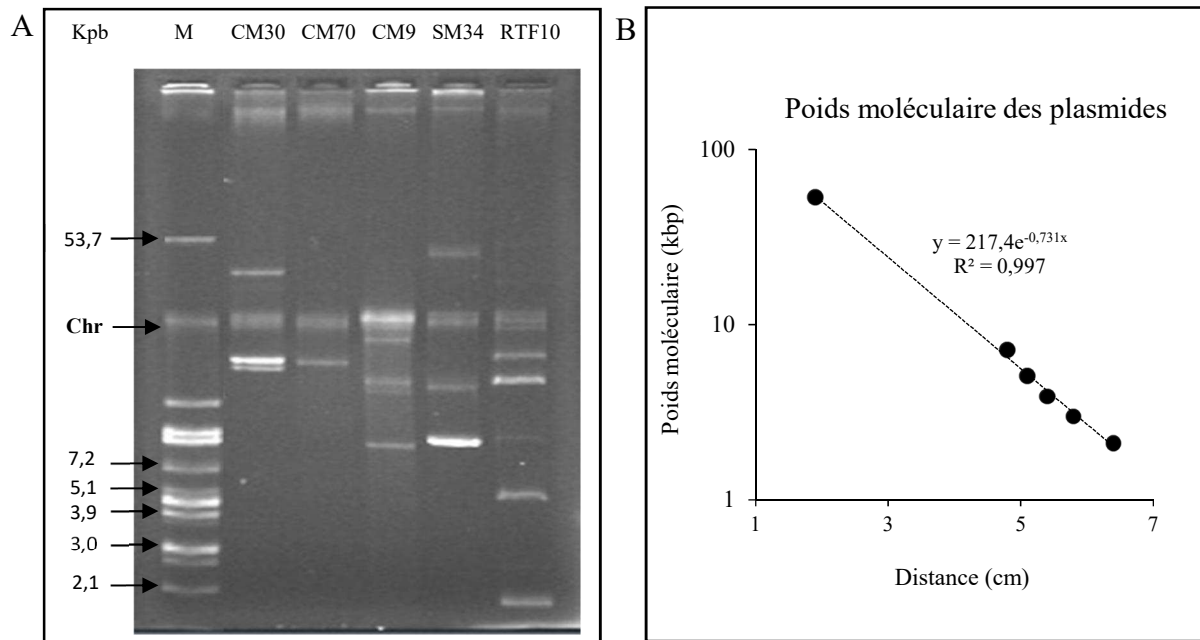


Figure 47. Profil plasmidique des souches de *Leuconostoc*. (A) gel d'agarose, coloré avec le bromure d'éthidium, présentant le profil plasmidique des souches de *L. mesenteroides* CM30, CM70, CM9, SM34 et RTF10. Chr : ADN chromosomique (M) préparation plasmidique de la souche *E. coli* V517 utilisée comme marqueur de poids moléculaire et (B) la courbe de la distribution du poids moléculaire du marqueur (M) en fonction de la distance sur le gel.

Toutes les souches de *L. mesenteroides* CM30, CM70, CM9 et SM34, isolées des laits ont présenté des profils plasmidiques différents. Cette variable est interprétée par la détection d'une seule bande de plasmide, dans la préparation de l'ADN de la souche CM70 jusqu'à la détection de quatre bandes pour les préparations de CM9 et SM34 qui peut correspondre à des plasmides avec une taille qui se situe entre 46,83 kbp et 7,53 kbp. Par contre la souche *L. mesenteroides* RTF10, isolée du produit carné, présentait un profil tout à fait distinct avec de deux à cinq bandes plasmidiques dont le plus petit avait une taille de 1,74 kbp (Fig. 47A). Les tailles ont été calculées à partir de la courbe du marqueur utilisé comme une référence de distribution des poids moléculaire sur le gel d'agarose (Fig. 47B).

13-2- Détection des gènes *dsr* partiels

Au début de ce travail, les séquences de nucléotides de 14 gènes (*dsr*) codant pour les dextrane-saccharases (Dsr) bactériennes, déposées dans la banque des données NCBI ont été analysés avec le programme MegAlign (DNASTAR 5.0.1) et Clustalx 2.1. Par conséquent, il s'est identifié une région conservée commune dans la séquence codante du centre catalytique des enzymes. Cette séquence a été utilisée pour concevoir les oligonucléotides *dsrF* et *dsrR*, utilisées dans cette étude génétique.

La PCR réalisée en utilisant ces oligonucléotides et la Taq polymérase a détectée un amplicon de 698 pb a été obtenu à partir de deux préparations d'ADN génomique et plasmidique des souches étudiées (Fig. 48).

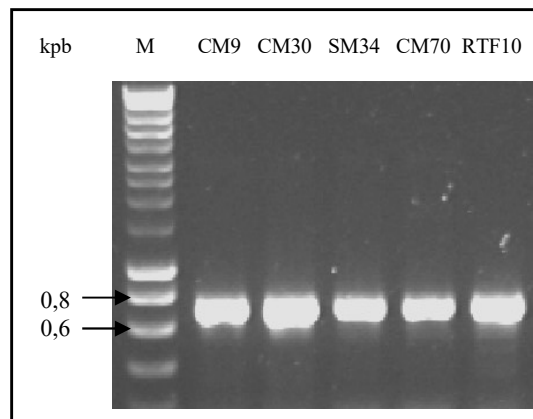


Figure 48. Détection par PCR les gènes *dsr*. Analyse en gel d'agarose des réactions de PCR avec les préparations de l'ADN plasmidique des souches de *L. mesenteroides* CM9, CM30, SM34, CM70 et RTF10. (M) marqueur de poids moléculaire Smart Ladder.

La souche non productrice *L. mesenteroides* CM70 a présenté un amplicon identique aux autres souches productrices en utilisant ADN_p. Les produits de PCR ont été purifiés et séquencés pour la confirmation de l'appartenance du gène codant. Les séquences des souches de *L. mesenteroides* CM9, CM30, SM34 et RTF10 obtenues ont été analysées avec le programme BLAST où 99% d'identité a été observée avec les séquences déposées dans les bases de données du gène codant pour la Dsr appartenant à différentes souches de *L. mesenteroides*. La séquence de l'amplicon de la souche *L. mesenteroides* CM70 a présenté une 99% avec la séquence du gène *dsrT* codant pour la DsrT de *L. mesenteroides* (numéro d'accèsion GenBank AB020020) et 98% avec le gène *dsrP* codant pour la DsrP (de *L. mesenteroides* IBT-PQ (numéro d'accèsion GenBank AY504865.1).

Les préparations d'ADN_p de la souche *Lb. sakei* MN, aussi a montré un amplicon identique aux autres souches (résultats non représenté). La séquence de cet amplicon présentait une identité de 100% avec la séquence le gène de *Lb. curvatus* TMW 1.624 (Numéro d'accession GenBank HE972512) et 99% avec *Lb. sakei* kg15 (numéro d'accession GenBank AY697434).

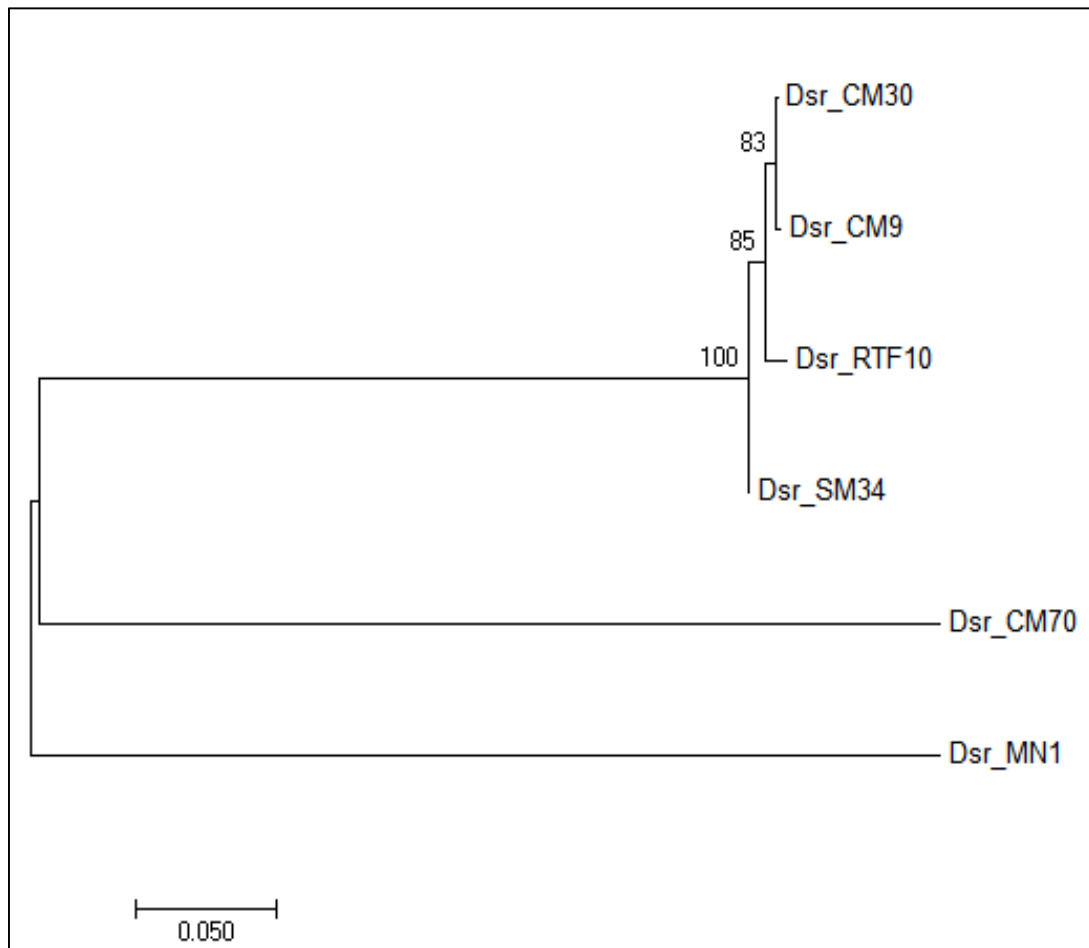


Figure 49. Arbre phylogénétique des séquences partielles du gène *dsr* des BL. Symbols : le gène codant pour la dextrane-saccharase (Dsr_) de souches de *L. mesenteroides* CM9, CM30, SM34, CM70 et RTf10 et *Lb. sakei* MN1.

Pour comparer l'identité des séquences conservées du gène codant pour la Dsr, l'arbre phylogénétique a été établi par le programme Mega 7.0, en utilisant la méthode Neighbor-Joining et cela après alignement par ClustelW. Le pourcentage de similitude a été ensuite calculé pour compléter la comparaison. Les résultats ont montré qu'il ait une différence entre les séquences étudiées. Le fragment de gène *dsr* des souches de *L. mesenteroides* CM9 et CM30 sont les plus identiques avec un pourcentage de similitude de 99,86%, la *dsr* a présenté un taux de similitude de 93,46% et 93,6% avec le gène *dsr* des souches citées précédemment, respectivement. Il a été clairement observé que le gène *dsr* de *L. mesenteroides* CM70

appartenait à une autre famille différente a première famille du gène *dsr* CM9, CM30, RTF10 et SM34, avec un pourcentage de similitude de 62,03%, 62,16%, 60,5% et 62,58%, respectivement. Le gène *dsr* de la souche *L. sakei* MN1 appartenait aussi à une famille distincte des deux premières familles, en montrant un pourcentage de similitude compris entre 54,52% et 63%.

14- Propriétés rhéologiques des dextranes obtenus

Pour pouvoir expliquer la différence entre les deux aspects des dextranes produits par les souches de *L. mesenteroides* CM9, CM30, SM34 et RTF10 ainsi que *Lb. sakei* MN1 pendant la croissance en présence de saccharose, une étude des propriétés rhéologiques a été établie en ayant testé douze concentrations différentes de 0,2% jusqu'au 5% par un viscoélastomètre en deux étapes distinctes à 20 °C.

Le comportement d'écoulement résultant de l'analyse des données de viscosité apparente (η) en fonction des taux de cisaillement (γ) (1-500 s⁻¹) ont montré que tous les dextranes étudiés possédèrent le même profil avec deux comportements rhéologiques différents qui varie avec la concentration des polymères utilisée. Le premier est le comportement Newtonien qui est noté à des concentrations assez basses, où la viscosité est stable (η_0) et indépendante des taux de cisaillement. Les limites de concentration supérieures pour ce plateau Newtonien ou linéaire (Fig. 50) étaient respectivement de 1,0%, 0,8%, 0,4%, 0,6% et 0,8% pour les EPS MN1, EPS CM30, EPS SM34, EPS RTF10 et EPS CM9. A partir de ces concentrations, les dextranes ont changé de comportement pour passer à un autre modèle non Newtonien, puisque leur viscosité apparente a diminué avec l'augmentation du taux de cisaillement, ce qui est appelé le comportement pseudo plastique.

La liaison entre la viscosité extrapolée, exprimant la viscosité Newtonienne (état de repos à cisaillement nul) de chaque polymère, et les concentrations utilisées nous a permis d'extraire la concentration critique (C^*) des cinq dextranes. C^* a été calculée en effectuant une double parcelle logarithmique de la viscosité Newtonienne par rapport aux douze concentrations des dextranes. En utilisant le modèle Cross (voir l'équation (2) dans la partie du Matériel et Méthodes), la viscosité Newtonienne des cinq dextranes a été déterminée par régression.

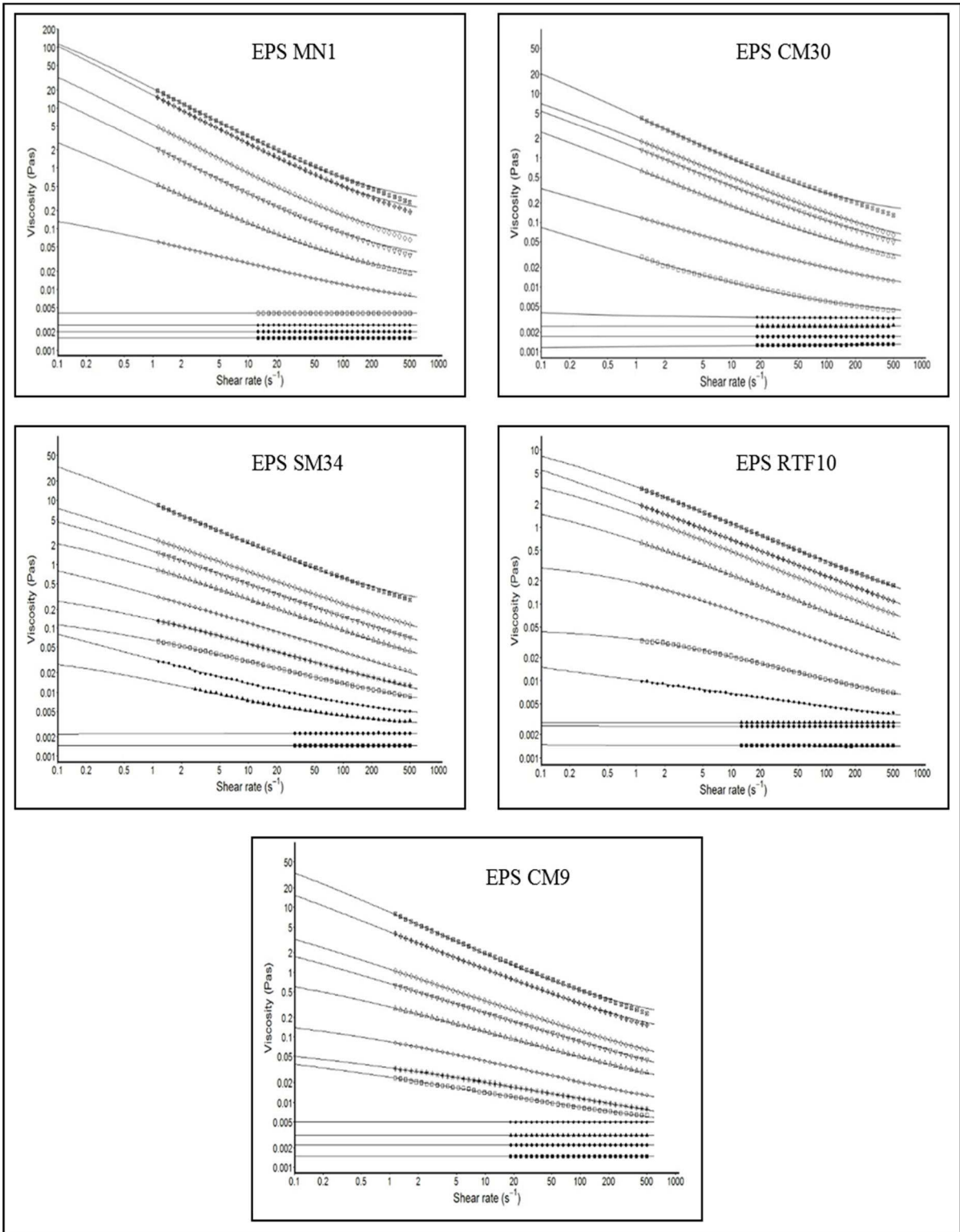


Figure 50. Viscosité apparente en fonction des taux de cisaillements des dextrans produits par les BL. 0.2% (■), 0.4% (●), 0.6% (▲), 0.8% (◆), 1% (□), 1.25% (*), 1.5% (○), 2% (Δ), 2.5% (∇), 3% (◇), 4% (⊕), 5% (⊗).

Deux lignes droites ont été obtenues, ce qui correspond aux deux domaines : dilué et plus concentré (Fig. 51). Les résultats ont suggéré que la viscosité newtonienne augmente avec la concentration de dextrane et que C^* des cinq dextrans varie entre 0,5% et 1% (Tableau 15).

Tableau 15. Données extraites de la relation directe entre la viscosité Newtonienne et les concentrations utilisées

Dextrans	Pente (a) du domaine dilué	Pente (b) du domaine concentré	Concentration critique (C^*)
EPS MN1	0,5	9,3	1,0
EPS 30	0,7	7	0,78
EPS 34	0,7	5,3	0,5
EPS RTF10	0,7	5,6	0,65
EPS CM9	0,8	6,1	0,84

La relation directe entre la viscosité et la concentration permet aussi l'extraction d'autres informations complémentaires et données rhéologiques nécessaires, principalement le nature de chaîne du polymère. Des valeurs de la pente (b) du domaine concentré entre 5,6 et 9,3 (Tableau 15) ont été obtenues lorsque l'équation 3 (voir la partie matériel et méthodes) a été appliquée à la deuxième ligne droite de chacun des cinq dextrans. Ces données nous a permis de déterminer la nature des polymères comme une bobine aléatoire avec des chaînes flexibles. En outre, les résultats obtenus (Fig. 52) ont montré que la viscosité Newtonienne des solutions aqueuses des polymères à 3% (p/v) (viscosité représentative du domaine concentré) varie entre 158 Pas et 13,44 Pas dont le dextrane MN1 a présenté la viscosité la plus élevée et le dextrane CM9 la viscosité la plus basse. Aucune variation significative de la viscosité apparente dans les solutions individuelles de dextrans n'était observée ni à un faible taux de cisaillement (10 s^{-1}) (résultats non représentés) et ni à une forte vitesse de cisaillement (206 s^{-1}) (Fig. 52).

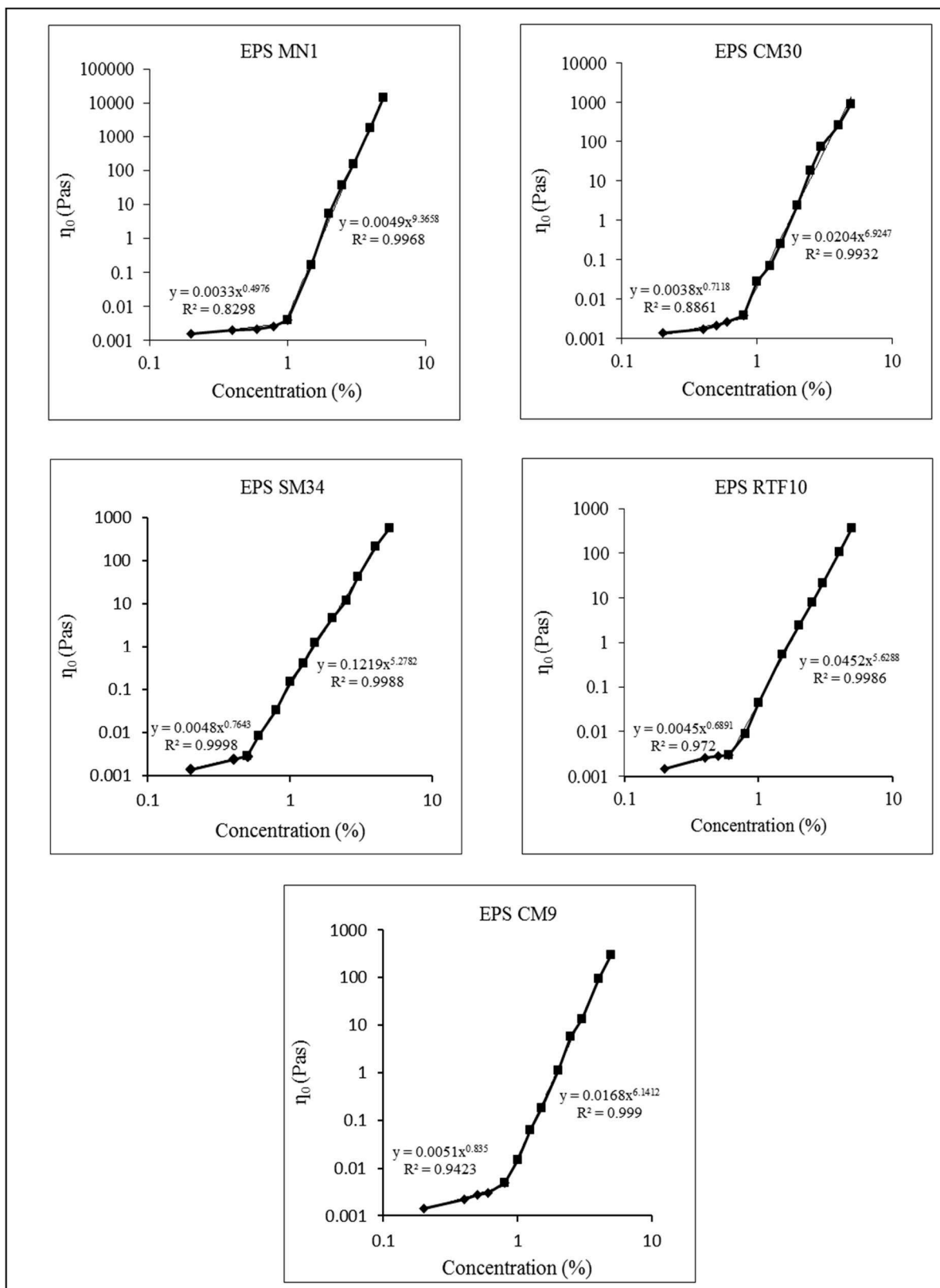


Figure 51. Viscosité Newtonienne en fonction des concentrations des cinq dextrans étudiés.

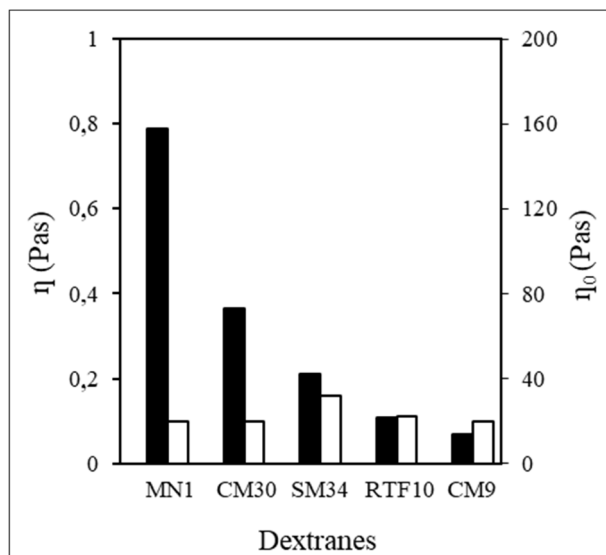


Figure 52. Viscosité des solutions aqueuses des dextrans à 3%. À un taux de cisaillement $\gamma = 0$ (η_0 , noir) et à $\gamma = 216 \text{ s}^{-1}$ (η , blanc).

15- Effet immunomodulateurs des dextrans sur les macrophages PMA-THP-1

Pour analyser les effets fonctionnels possibles de ces α -(1,6) glucanes ramifiés en position de *O*-3 type dextrane, les EPS synthétisés par les souches de *L. mesenteroides* CM9, CM30, SM34 et RTF10 et *Lb. sakei* MN1 et purifiés par chromatographie d'exclusion ont été utilisés. En plus, d'autres dextrans commerciaux de différentes masses moléculaires ont été testés dans les mêmes expériences comme T10, T40, T2000 et cela pour voir l'effet des masses moléculaires sur la bioactivité des polymères.

15-1- Effet des dextrans sur l'activité métabolique des macrophages

L'analyse avec le kit de prolifération XTT n'a montré aucun effet néfaste des traitements avec l'EPS CM9, qui a été choisi pour réaliser le test de cytotoxicité, sur la viabilité et, par conséquent, sur l'activité métabolique des macrophages PMA-THP-1 (Fig. 53). En outre, dans toutes des concentrations des EPS testées (5, 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$), le taux de survie était supérieur à celui du témoin non traité (100%). Ce qui montre que le dextrane produit par la souche *L. mesenteroides* CM9 est un polymère non toxique.

Sur la base de ces résultats, et pour des expériences ultérieures, la concentration représentative des dextrans testés était de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

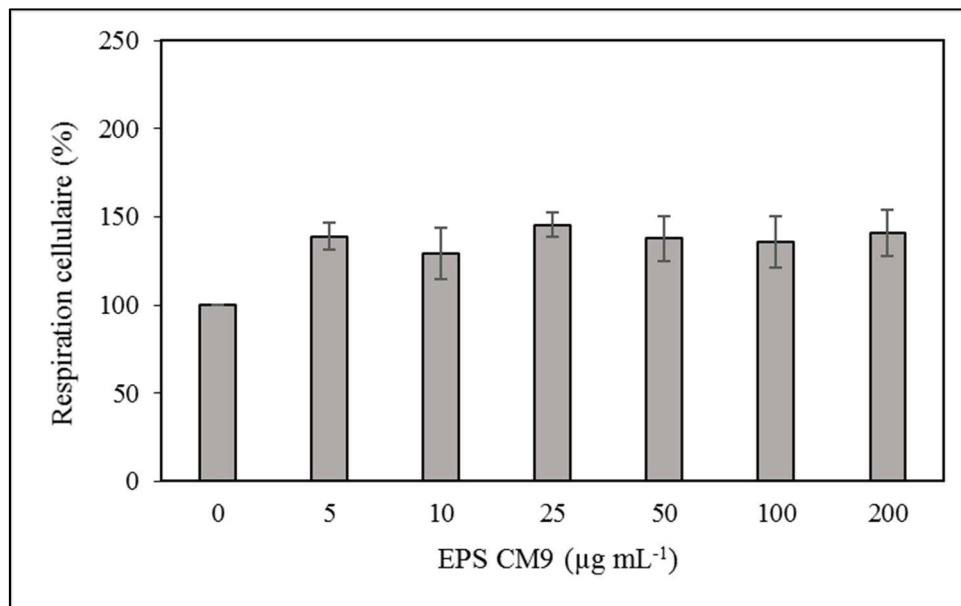


Figure 53. Test de cytotoxicité XTT des macrophage PMA-THP-1 traités par le dextrane produit par *L. mesenteroides* CM9.

15-2- Effet des dextranses sur la régulation de l'inflammation par les macrophages

L'influence des deux types de dextranses détectés phénotypiquement, d'un côté les EPS CM30, EPS SM34 et EPS RTF10 et d'un autre les EPS CM9 et EPS MN1, ayant possédé une masse moléculaire assez élevée par rapport aux dextranses commerciaux T10, T40 et T2000, a été étudiée sur les macrophages THP-1 différenciés par PMA (Fig. 54). Et cela, en comparant leur effet avec celui du LPS de *E. coli* sur la sécrétion des cytokines pro-inflammatoire TNF- α et anti-inflammatoire IL-10.

L'évaluation des niveaux des deux cytokines dans les surnageants des cellules PMA-THP-1 (Fig. 55) a montré que le traitement par LPS O111: B4 seul était capable de déclencher le processus inflammatoire dans le modèle cellulaire THP-1, en ayant induit la production des cytokines (Fig 55A et 55B). En outre, comme prévu dans le rôle inflammatoire du LPS de *E. coli*, le ratio TNF- α /IL10 (Fig. 55C) a augmenté considérablement.

Cette activation des macrophages a été partiellement neutralisée par l'emploi d'un co-traitement avec tous les dextranses testées en diminuant les niveaux de TNF- α et en augmentant les niveaux d'IL-10, effet qui a entraîné une diminution significative du ratio inflammatoire TNF- α /IL10 (Fig. 55C).

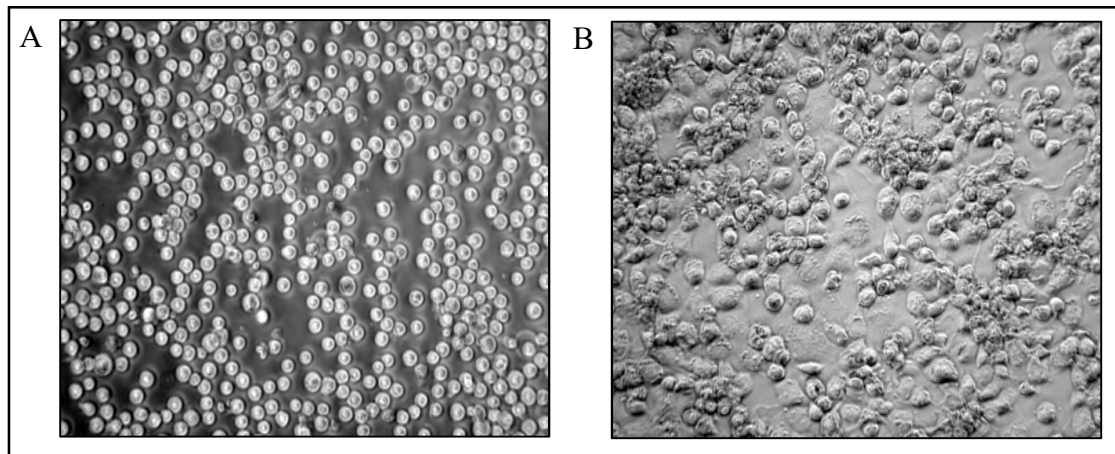


Figure 54. Différenciation des monocytes en macrophages par l'addition de 40 nM de PMA.

(A) monocytes THP-1 et (B) macrophages PMA-THP-1.

Les données ont été analysées en utilisant l'analyse de variance (Anova). Le test de Dunnett a été utilisé pour tester les différences statistiquement significatives entre le contrôle et des échantillons. Les comparaisons significatives au niveau de 0,05 sont indiquées par ***.

Étant donné que la même concentration pondérale en volume ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) a été utilisée pour tous les dextrans possédant une masse moléculaire différentes, on s'attend à une variabilité d'influence sur la production des cytokines.

Le traitement par les dextrans (commerciaux et ceux produits au laboratoire) a déclenché une sécrétion de cytokines anti-inflammatoire IL-10 significativement plus élevée que ceux induits par LPS ($p < 0,05$) (Fig. 55B), tandis que, l'inverse a été obtenu dans le cas des cytokine pro-inflammatoire TNF- α , où les niveaux des cytokines produites en présence unique du LPS était significativement plus élevée ($p < 0,05$) (Fig. 55A).

Ainsi, pour les dextrans commerciaux, une corrélation partielle de leur effet avec les masses moléculaires a été observée, avec T2000 possédant le plus bas et T10 le plus élevé effet anti-inflammatoire et résultant, respectivement, des rapports TNF- α /IL10 les plus élevés et les plus bas (Fig. 55C). En outre, aucune corrélation n'a été observée entre la masse moléculaire et l'effet immunomodulateur dans le cas des dextrans CM9, MN1, RTF10, SM34, CM30.

Malgré leur masse moléculaire élevée, les EPS analysés dans ce travail ont un effet anti-inflammatoire plus prononcé (taux inférieur de TNF- α /IL10) que T2000, et les EPS des quatre HoPS produits par les souches de *L. mesenteroides* ont une influence bénéfique similaire à celle de T10 (Fig. 55).

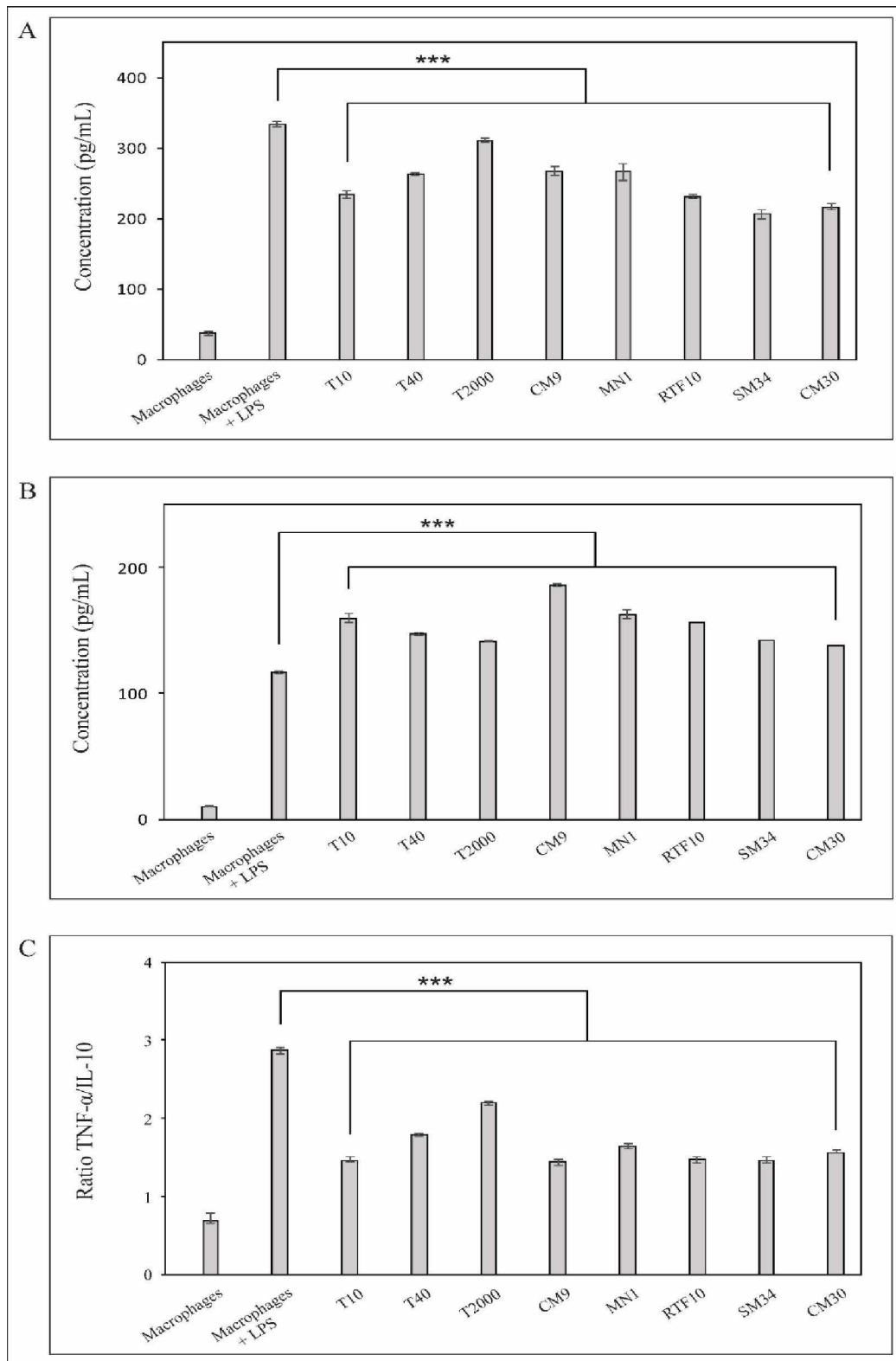


Figure 55. Influence des dextrans sur la production des cytokines produites par les macrophages PMA-THP-1 stimulés par LPS (*E. coli* O111:B4). (A) TNF- α , (B) IL-10 et (C) ratio TNF- α /IL-10.

16- Formation des biofilms

La capacité des souches de *L. mesenteroides* CM30, CM9 productrice de dextrane et la non productrice CM70 à former des biofilms a été étudiée en présence de saccharose et de glucose, séparément, en plaque de polystyrène de 96 puits. La souche de *Lb. sakei* MN1, connue par sa capacité à produire des biofilms, a été utilisée comme un contrôle positif. Les souches ont été ensemencées dans leurs puits appropriés à une DO_{595nm} de $0,03 \pm 0,005$; $0,06 \pm 0,01$; $0,06 \pm 0,005$ et $0,02 \pm 0,015$ en milieu MRSG et à une DO_{595nm} de $0,05 \pm 0,005$; $0,06 \pm 0,005$; $0,06 \pm 0,005$ et $0,03 \pm 0,011$ en milieu MRSS pour être incubé pendant 48 h à 30 °C, sans aucune agitation. Les mesures réalisées à DO_{595nm} , après la solubilisation du cristal violet en éthanol sont représentées dans le panneau B de la Fig. 56.

Par conséquent, les résultats obtenus ont montré que *L. mesenteroides* CM9, CM30 sont capables de former des biofilms en présence du dextrane produit à partir du saccharose. En présence de glucose, seulement la souche CM9 qui avait la capacité de les produire mais à un taux faible. L'expérience aussi a exposé une capacité de *Lb. sakei* MN1 à former les biofilms en présence du glucose et du saccharose avec presque le même taux. La souche non productrice des EPS *L. mesenteroides* CM70 était dépourvue de cette propriété, elle n'a formé les biofilms ni en présence du glucose ni en saccharose (Fig. 56).

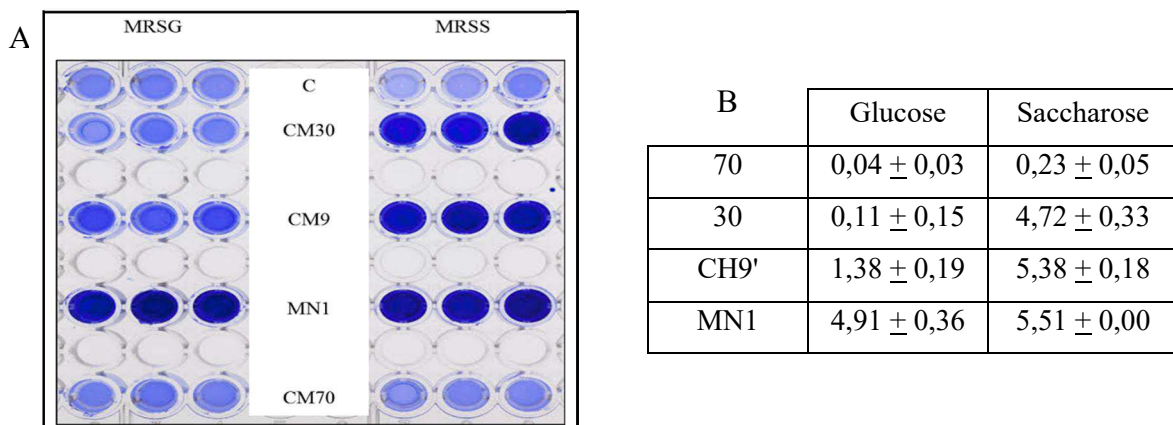


Figure 56. Détection de la formation des biofilms en présence du glucose et du saccharose des souche de *L. mesenteroides* CM9, CM30 et CM70 et *Lb. sakei* MN1. C, contrôle représentant le milieu MRSS et MRSG.

17- Aptitudes probiotiques des isolats

17-1- Tolérance à l'acidité

La survie des souches aux conditions drastiques du tube digestif représente un des caractères des probiotiques. Pour cela, l'étude de l'exposition prolongée des souches aux conditions acides similaires à celles de l'estomac est réalisée par incubation de ces derniers à différents pH pendant 3 h. D'après les résultats obtenus, toutes les souches ont possédé une résistance à pH 3,0 supérieure à pH 2,0. Les souches CM30 et CM70 testées ont montré une basse tolérance à l'acidité avec un pourcentage de $9,37 \pm 0,12\%$ et $7,56 \pm 0,6\%$ à pH 2,0 et $11,85 \pm 0,15\%$ et $8,52 \pm 0,15\%$ à pH 3,0 respectivement. Tandis que la souche CM9 a montré une tolérance plus élevée avec $18,75 \pm 0,5\%$ à pH 2,0 et $26,58 \pm 0,3\%$ à pH 3,0 (Tableau 16).

Les trois souches ont donné une bonne croissance sur le milieu témoin pH 7 qui atteint les 100% d'où l'élévation du nombre de cellules initial.

Tableau 16. Influence de l'acidité, la présence des sels biliaires et la pepsine sur le pourcentage de survie des souches de *L. mesenteroides*

Paramètres Souches	Acidité (%)		Sels biliaires (%)			Pepsine (%)	
	pH 3,0	pH 2,0	0,3%	1,0%	2,0%	pH 3,0	pH 2,0
CM9	$26,58 \pm 0,3$	$18,76 \pm 0,5$	$28,65 \pm 0,08$	$21,58 \pm 0,9$	$16,81 \pm 0,5$	$22,69 \pm 0,36$	$11,84 \pm 0,8$
CM30	$11,85 \pm 0,15$	$9,37 \pm 0,12$	$12,67 \pm 0,3$	$9,56 \pm 0,8$	$7,58 \pm 0,15$	$10,74 \pm 0,15$	$6,87 \pm 0,55$
CM70	$8,52 \pm 0,15$	$7,56 \pm 0,6$	$7,82 \pm 0,09$	$5,94 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,35$	$9,04 \pm 0,09$	$3,3 \pm 0,15$

1-1- Tolérance aux sels biliaires

Les trois souches testées présentent une résistance différente à l'exposition aux sels biliaires à trois différentes concentrations 0,3%, 1% et 2,0% dont le pourcentage de survie diminue avec l'augmentation des concentrations des sels. Après la fin de l'exposition des souches au stress biliaire, les taux des croissances bactériennes représentaient $28,65 \pm 0,08\%$; $12,67 \pm 0,3\%$ et $7,82 \pm 0,09\%$ à 0,3% de sels biliaires et $16,81 \pm 0,5\%$; $7,58 \pm 0,15\%$ et $2,2 \pm 0,35\%$ à 2,0% de sels biliaires pour les souches CM9, CM30 et CM70, respectivement. Selon les résultats montrés au Tableau 16, on remarque que le taux de survie, le plus élevé, est atteint par la souche CM9. La croissance en absence de sels biliaires (0%) ayant atteint les 100% a été utilisé comme témoin à la base du lequel, les autres taux de survie ont été calculés.

17-2- Tolérance à la pepsine

La croissance en présence de l'enzyme gastrique, la pepsine, combiné avec abaissement du pH à 2 et à 3, est employée pour évaluer la capacité des trois souches à résister au passage au sac gastrique. D'après les résultats obtenus qui sont illustrés dans le Tableau 16, des taux de survies très faible ont été remarqués chez toutes les souches. Le pourcentage de croissance, en présence de 3 mg mL⁻¹ de pepsine à un pH de 2, de la souche CM9 était de $11,84 \pm 0,8\%$, un taux qui représente le double du pourcentage trouvé chez la souche CM30 et le triple de la résistance notée chez la souche CM70. La croissance des souches en présence de la pepsine à un pH 3, était un peu plus élevé par rapport au test précédent, les souches CM30 et CM70 ont présenté presque les mêmes taux avec $10,74 \pm 0,15\%$ et $9,04 \pm 0,09\%$, respectivement. Alors que la souche CM9 a montré quasi le double de leur résistance avec $22,69 \pm 0,36\%$.

17-3- Réponse au stimulus stomaco-duodéal

La réponse des leuconostocs au stimulus stomaco-duodéal est reflétée par leur taux de résistance à plusieurs barrières testées. Selon les résultats représentés dans le Tableau 17, les taux de survie des trois bactéries mises au test tendent à se réduire après 3 h d'incubation et cela après l'ajout des sécrétions duodénales synthétiques au milieu. La souche CM9 a possédé le taux le plus élevé avec $32,58 \pm 0,7\%$ et $23,58 \pm 0,5\%$ après 1 h et 3 h d'incubation, respectivement. Les souches CM30 et CM70 ont montré une résistance aux conditions défavorables, imposées par la composition de ce milieu, assez semblable et moins élevée et comme il est indiqué au-dessous.

17-4- Test de l'hydrophobicité

Ce test permet d'évaluer l'hydrophobicité de la surface cellulaire des bactéries employées vis-à-vis du xylène qui peut refléter, d'une autre manière, le potentiel de leur colonisation aux mucus intestinale. Les résultats classés dans le Tableau 17 ont montré que les souches mises au test présentent une faible hydrophobicité, cela témoigne une faible sélectivité des surfaces membranaires. La valeur la plus élevée ($45,65 \pm 0,7\%$) est enregistrée avec la souche CM9 et la plus faible est celle de la souche CM70 ($25,82 \pm 0,5\%$).

17-5- Résistance au phénol

Pour qu'une souche soit probiotique, elle doit survivre à l'action des métabolites toxiques, principalement des phénols produits lors du processus de digestion. Les résultats de l'effet de la concentration de 0,4% de phénol sur la croissance des trois souches de *L. mesenteroides* après

24 heures d'incubation dans le milieu MRS à 30 °C sont groupés dans le Tableau 17. À cette concentration de phénol, les souches examinées ont montré des degrés de sensibilité assez importants. La tolérance la plus élevée ($20,36 \pm 0,1\%$) a été remarquée chez la souche CM9, suivie par la souche CM30 ($7,52 \pm 0,03\%$), tandis que CM70 avait la plus faible tolérance ($4,69 \pm 0,05\%$).

Tableau 17. Influence du stimulus gastro-intestinal, d'hydrophobicité et de la présence du phénol sur le pourcentage de survie des souches de *L. mesenteroides*

Paramètres Souches	Stimulus gastro-intestinal (%)		Hydrophobicité (%)	Phénol (%)
	1 h	3 h		
CM9	$32,58 \pm 0,7$	$23,58 \pm 0,5$	$45,65 \pm 0,7$	$20,36 \pm 0,1$
CM30	$16,07 \pm 0,15$	$13,16 \pm 0,17$	$28,67 \pm 0,35$	$7,52 \pm 0,03$
CM70	$15,35 \pm 0,3$	$10,56 \pm 0,32$	$25,82 \pm 0,5$	$4,69 \pm 0,05$

17-6- Thermorésistante

L'effet d'un chauffage modéré sur la viabilité de la croissance des souches de *L. mesenteroides* est indiqué dans le Tableau 18. Toutes les souches ont diminué de manière significative de leur nombre à mesure que la température ou le temps de traitement augmentaient. Ainsi, comme on peut l'observer dans les résultats, aucune des souches n'a pu survivre à 80 °C pendant 1 min ou même 5 min. Par contre, toutes les souches ont bien résisté pendant 1 min à 60 °C et aussi elles ont bien survécu pour une exposition de 5 min à la même température dont la plus faible résistance était de $35,41 \pm 0,4\%$ présentée par la souche CM70.

Tableau 18. Effet de la thermorésistance sur la croissance des souches des *L. mesenteroides*

Paramètres Souches	Thermorésistante (%)	
	60 °C	
	1 min	5 min
CM9	$72,58 \pm 1,2$	$59,12 \pm 0,85$
CM30	$52,34 \pm 0,9$	$40,07 \pm 0,57$
CM70	$41,31 \pm 0,35$	$35,41 \pm 0,4$

17-7- Résistance aux antibiotiques

La résistance et la sensibilité des souches aux antibiotiques représente une préoccupation majeure pour les chercheurs car ces propriétés peuvent limiter les applications des cultures probiotiques. Les trois souches mises en test ont montré une résistance aux céfazoline,

ofloxacine, oxacilline, pefloxacine et à la vancomycine dont leur diamètre de zone d'inhibition était égal ou inférieur à 15 mm (Fig. 57), comme indiqué dans le Tableau 19. Il faut signaler que cette résistance et sensibilité trouvées dans notre étude, peuvent être liées à la concentration de chaque antibiotique d'où la nécessité de tester plusieurs concentrations pour confirmer les résultats.

Tableau 19. Résultats du test de sensibilité aux antibiotiques des souches de *L. mesenteroides*

Antibiotiques	Charge du disque (μg)	Symbole	CM9		CM30		CM70	
Amoxicilline + Acide Clavulanique	20 μg + 10 μg	AMC	30	S	28	S	18	R
Ampicilline	10 μg	AM	0	R	32	S	27	S
Cefazoline	30 μg	CZ	15	R	15	R	13	R
Cefotaxime	30 μg	CTX	19	I	23	S	25	S
Cefoxitine	30 μg	FOX	23	S	25	S	17	I
Ofloxacine	5 μg	OFX	13	R	15	R	14	R
Oxacilline	1 μg	OX1	0	R	0	R	0	R
Pefloxacine	5 μg	PEF	0	R	0	R	0	R
Penicilline	6 μg / 10 IU	PEN	31	S	28	S	35	S
Tetracycline	30 μg	TE	29	S	31	S	40	S
Vancomycine	30 μg	VA	0	R	0	R	0	R

(R) résistance, (I) intermédiaire et (S) sensible.

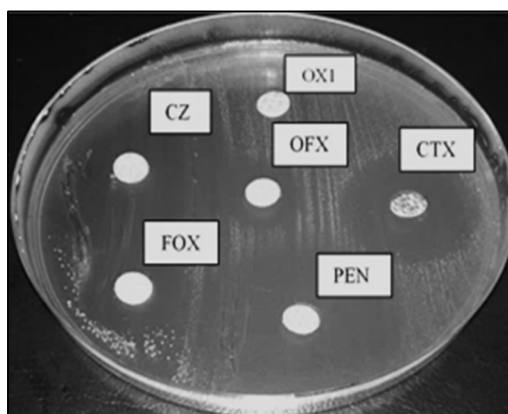


Figure 57. Antibiogramme de la souche CM9 vis-à-vis cinq antibiotiques.

17-8- Activité antimicrobienne

Dans le but d'évaluer la capacité de nos des souches à produire des substances antimicrobiennes, elles ont été testées pour leurs activités inhibitrices vis-à-vis les souches indicatrices *S. aureus* et *E. coli* par la méthode directe et indirecte. L'ampleur relative des inhibitions observées dans les deux méthodes a été appréciée par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions, obtenus autour des touches et des puits.

Dans la méthode directe, les trois souches testées ont présenté une activité inhibitrice vis-à-vis de la souche indicatrice *S. aureus* avec des diamètres de halos d'inhibition qui varient entre 17 et 19 mm, tandis que, l'intervalle d'inhibition était entre 15 et 17 mm pour la souche indicatrice *E. coli*. A ce stade d'étude, l'effet inhibiteur observé peut être attribué à n'importe quel facteur antibactérien produit par les souches étudiées principalement l'acide lactique et/ou une substance protéique comme les bactériocines. Pour cela, on est passé à la méthode indirecte pour sélectionner plus au moins la nature l'agent antimicrobien. Cette dernière permet de détecter l'activité antagoniste dans les surnageants de culture des souches inhibitrices. C'est-à-dire de détecter seulement les inhibitions dues à la production d'agents antibactériens sécrétés et d'éliminer celles dues au contact cellulaire.

Il est communément admis que le pouvoir inhibiteur des bactéries lactiques est très souvent lié à leurs propriétés acidifiantes.

Dans le but d'éliminer la possibilité d'antagonisme par ce métabolite, on a utilisé le milieu MRS tamponnée avec du tampon phosphate à pH 7 en utilisant la méthode directe et la méthode de diffusion en puits. La méthode directe en éliminant l'acidité a détecté une activité similaire avec un diamètre plus réduit (Tableau 20). Les surnageants de culture de toutes les souches ont révélé une activité inhibitrice vis-à-vis les deux souches indicatrices seulement pour la souche CM70. Le diamètre d'halo d'inhibition obtenus pour *S. aureus* (21 mm), étaient plus larges par rapport à celui obtenus pour *E. coli* (18 mm), ces diamètres sont plus petits par rapport à ceux obtenus par la méthode directe employée en utilisant le milieu tamponné (Tableau 20). Ces résultats montrent que seule la souche CM70 possède la capacité des produire d'autres substances inhibitrices, principalement protéiques, en plus de la production des acides organiques (Fig. 58).

Tableau 20. Diamètres d'inhibition des souches pathogènes par les souches de *L. mesenteroides* obtenus par la méthode directe et indirecte.

		Diamètres des halos (mm)								
		MRS standard			MRS tamponnée à pH 7					
Productrices Indicatrices		Méthode directe			Méthode directe			Méthode indirecte		
		CM9	CM30	CM70	CM9	CM30	CM70	CM9	CM30	CM70
<i>S. aureus</i> ATCC 25923		17	18	19	ND	ND	15	ND	ND	16
<i>E. coli</i> ATCC 25922		15	14	17	ND	ND	14	ND	ND	15

ND : non détection

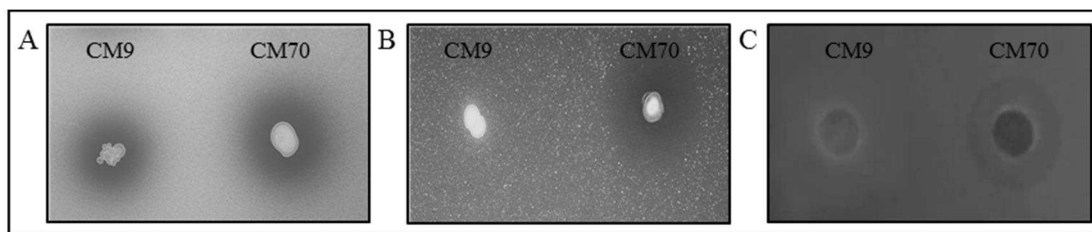


Figure 58. Inhibition bactérienne par les souches de *L. mesenteroides* CM9 et CM70. (A) Méthode directe, (B) méthode directe sur milieu MRS tamponné pH 7,0 et (C) méthode indirecte en utilisant des surnageants tamponnés pH 7,0.

Les résultats obtenus montrent que l'activité antibactérienne de la souche inhibitrice CM70 persiste en milieu tamponné, cela indique que les inhibitions observées ne sont pas dues que à la production des acides organiques bien que ce dernier abaisse le pH du milieu vers la fin de la croissance, mais aussi à d'autres substances.

La mise en évidence de la nature protéique de l'agent inhibiteur a été effectuée en milieu tamponné en présence d'enzymes protéolytiques de type trypsine. Les agents inhibiteurs produits par la souche CM70 engendrent des halos d'inhibition de 22 mm et 18 mm de diamètre dans les puits témoin non traités non tamponné et tamponné, respectivement. Cette activité est abolie après traitement par la trypsine. En présence de cette dernière, on a noté une levée totale des inhibitions sans l'apparition des halos autour des puits testés (Fig. 59). Ces résultats permettent de conclure que les substances antibactériennes produites par nos souches sont de nature protéique et sont donc selon toute vraisemblance des bactériocines.

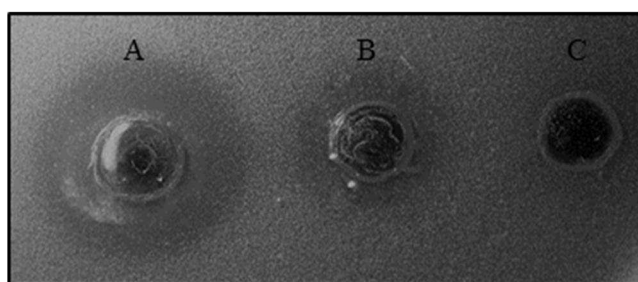


Figure 59. Sélection de la substance inhibitrice de nature protéique produite par *L. mesenteroides* CM70. (A) effet du surnageant non tamponné, (B) effet du surnageant tamponné à pH 7,0 et (C) addition de la trypsine au surnageant (B).

17-9- Adhésion aux cellules Caco-2

L'adhérence aux cellules épithéliales a été analysée par l'utilisation des cellules intestinales Caco-2, lignée cellulaire d'adénocarcinome colique humain. Cette capacité d'adhésion été évaluées par mise en contact les souches *Lb. sakei* MN1, *L. mesenteroides* RTF10, CM9, CM30

et SM34 aux cellules Caco-2 différenciées durant 21 jours (Fig. 60), en étudiant en parallèle l'influence de la synthèse du dextrane sur cette adhérence. La bactérie probiotique *Lb. acidiphilus* LA-5 a été aussi mise en test en présence de glucose comme contrôle.

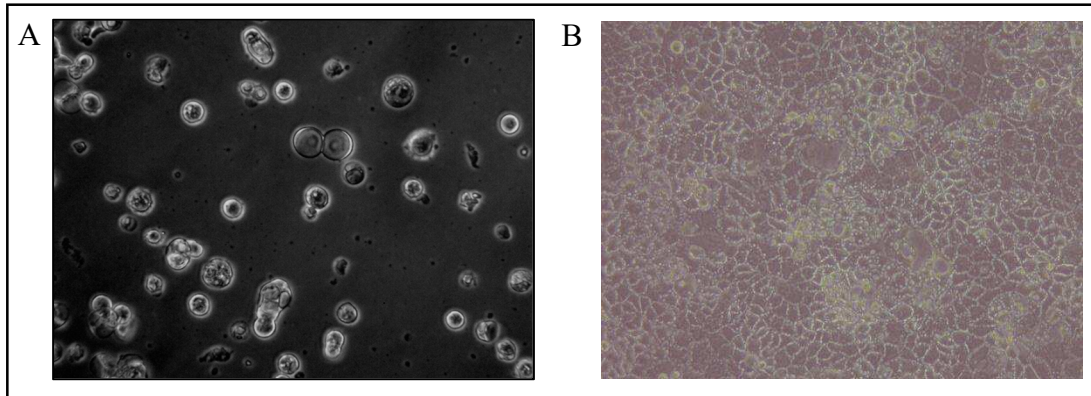


Figure 60. Différenciation des cellules Caco-2 en monocouche. (A) cellules non différenciées et (B) cellules après 21 jours de différenciation.

Les bactéries ont été mises en contact avec les cellules humaines Caco-2 pendant 1 h. Les bactéries adhésives aux cellules sont ensuite collectées puis dénombrées comme indiqué dans la partie du matériel et méthodes.

Les résultats ont révélé que MN1 et CM9 ont pu adhérer aux entérocytes avec un niveau de $4,9 \pm 0,43\%$ et $4,12 \pm 0,41\%$, respectivement, en présence de DMEM contenant du glucose (Fig. 61). Ces niveaux (environ 5%) sont proches à celui trouvé chez la souche probiotique LA-5 ($5,96 \pm 0,31\%$). En outre, l'adhérence des souches MN1 et CM9 aux cellules Caco-2 a diminué à $1,09 \pm 0,25\%$ et $2,55 \pm 0,21\%$, respectivement, lorsque le saccharose (0,5%) était présent dans le milieu DMEM. Ces résultats indiquent que seule la capacité d'adhérence de *Lb. sakei* MN1 et *L. mesenteroides* CM9 a été affectée par la présence de dextrane issu de l'utilisation du saccharose et significativement ($p \leq 0,05$) différentes à ceux trouvés en présence de glucose. En revanche, l'adhésion des souches de *L. mesenteroides* CM30 ($3,52 \pm 0,17\%$), SM34 ($3,68 \pm 0,36\%$) et RTF10 ($0,46 \pm 0,01\%$) n'ont pas été significativement affectées par la présence de saccharose, et par conséquent le dextrane, dans le milieu (Fig. 61).

Des photos montrant le contact bactérie/cellule et l'adhésion ont été prises en testant la souche *Lb. sakei* MN1[pCR12] marquée par fluorescence avec la protéine mCherry, qui se produit constitutivement.

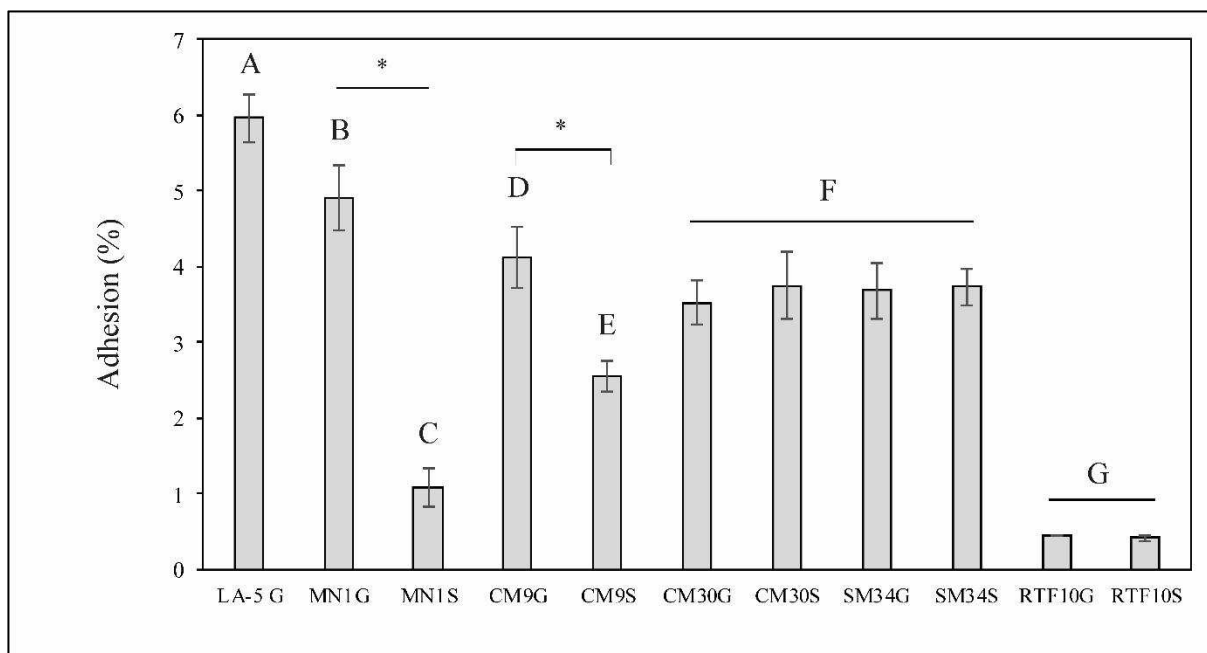


Figure 61. Adhésion des souches des BL aux cellules Caco-2. Les essais ont été réalisés dans DMEM (G) et DMEM supplémenté avec 0,5% de saccharose (S). Les niveaux d'adhérence des souches BL indiquées sont exprimés en pourcentage de ufc. 100% correspond au nombre de bactéries ajoutées aux cellules Caco-2.

L'adhésion de la souche *Lb. sakei* MN1[pRCR12], marquée avec le plasmide pRCR12, qui code pour la protéine autofluorescente mCherry, sur les cellules intestinales Caco-2 est indiquée dans la Fig. 62. Les cellules bactériennes ont pris une couleur rouge qui dû à la production de la protéine mCherry d'une façon stable. Cela indique que l'intégration du plasmide pRCR12 n'a aucune influence sur l'adhérence bactérienne.

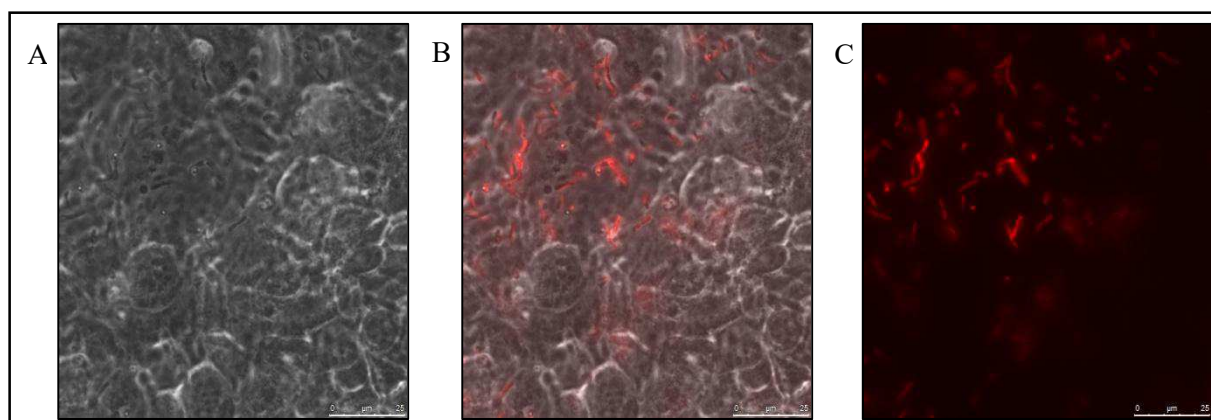


Figure 62. Adhésion de *Lb. sakei* MN1 [pCR12] sur les cellules intestinales Caco-2 après 1 h incubation à 37 °C détectée par la microscopie à contraste de phase (A) et fluorescence (C). B, Superposition des images représentées en A et C.

17-10- Détection de la colonisation bactérienne du poisson zèbre

Compte tenu de leur capacité à adhérer et, pour certaines, à former des biofilms, les souches de *L. mesenteroides* CM9, CM30 et CM70 ont été mises en étude afin de voir leur capacité de coloniser l'intestin des larves gnotobiotiques du poisson zèbre. Ces larves sont des formes développées issues des œufs obtenus par une fécondation *in vitro* (Fig. 63).

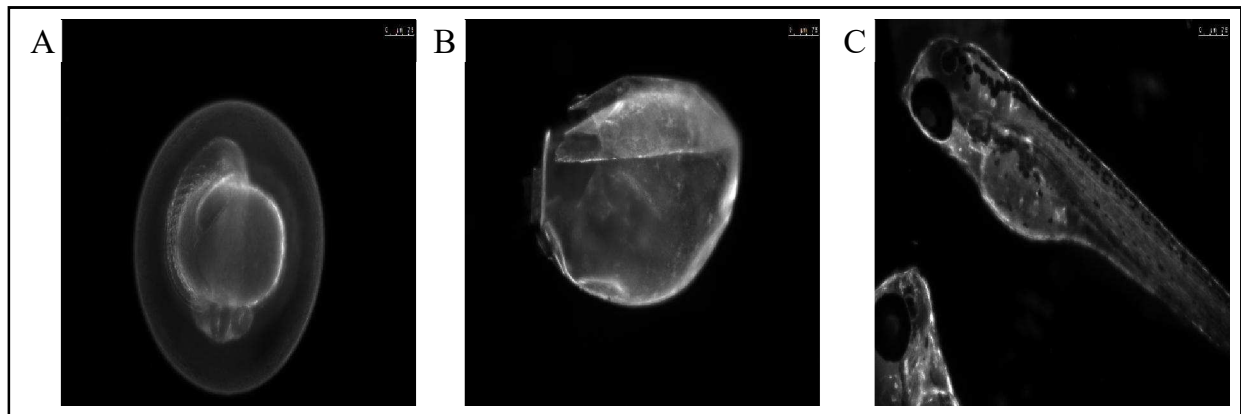


Figure 63. Etapes de développement du poisson zèbre employé dans l'expérience de colonisation. (A) stade d'embryon après 24 hpf (B) stade d'éclosion 48 hpf (C) larves après 96 hpf

Dès que les larves gnotobiotiques aient été transparentes avec un système digestif propre, elles sont prêtes pour être coloniser, les souches ont été additionnées selon le protocole mentionné dans la partie antérieure. La colonisation a été déterminée après 6 h et 24 h d'incubation avec les souches testées à 28 °C avec une agitation de 25 rpm en ayant appliqué des cycles de lumière/obscurité de 12 h.

Selon les résultats obtenus, la souche CM9 a présenté une capacité de colonisation moyenne avec une valeur de 16 ufc/larve après 6 h d'exposition, par rapport aux deux autres souches qui ont présenté presque aucune colonisation avec une moyenne de 3 ufc/larva et 1 ufc/larva pour les souches CM30 et CM70, respectivement. Après 24 h, le nombre de bactéries adhérentes a été vraiment réduit, presque nul, dont la valeur moyenne était de 2,12 ufc/larve, 0 ufc/larve et 0,33 ufc/larve pour les souches CM9, CM30 et CM70, respectivement (Fig. 64).

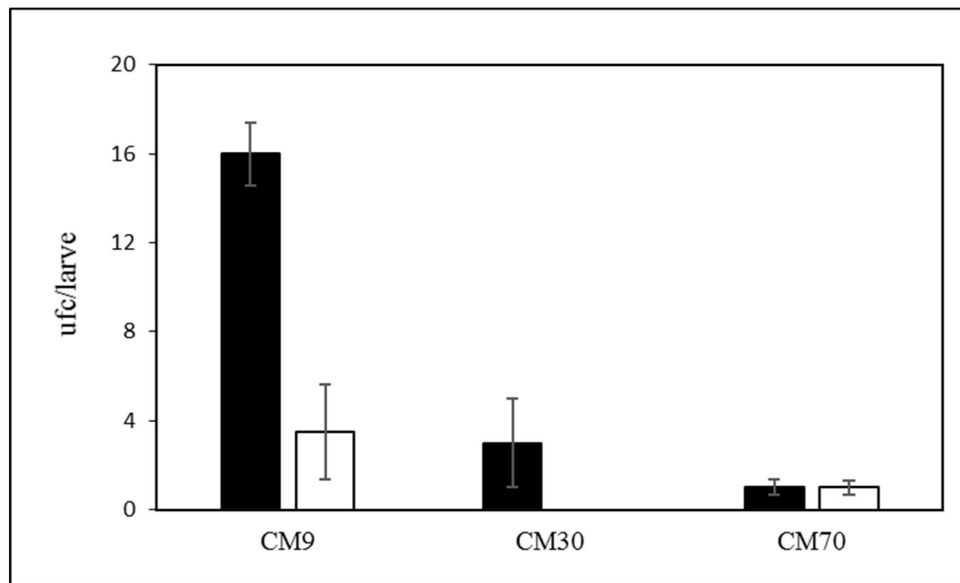


Figure 64. Colonisation des larves du poisson zèbre par les souches de *L. mesenteroides* dans le tube digestif. Le dénombrement sur plaque a été effectué après 6 h (barres noires) et 24 h (barres blanches) de l'infection.

Discussion

Certaines BL sont capables de synthétiser des EPS qui améliorent les propriétés rhéologiques des aliments fermentés, ce qui leur qualifie à être utilisé en industrie agro-alimentaire. En outre, certains d'entre eux se sont révélés avoir des propriétés bénéfiques pour la santé (antitumorales, immunomodulateurs ou prébiotique) et donc sont de bons candidats pour le développement d'aliments fonctionnels (Pérez-Ramos et al., 2015)

L'objectif de cette thèse de doctorat a porté sur la caractérisation phénotypique et moléculaire des souches de *Leuconostoc* isolées de différents habitats et l'étude de leurs aptitudes technologiques principalement l'étude physiologique, métabolique, physico-chimique et fonctionnelle des EPS.

1- Identification et typage des souches bactériennes

Afin d'isoler les souches mises en test, le milieu MSE (10 % de saccharose) a été employé vu leur utilité dans la sélection des leuconostocs productrices des EPS vu leur contenance de l'azide de sodium qui inhibe les bactéries à Gram négatif et les lactocoques qui coexistent avec les leuconostocs dans les différents écosystèmes, principalement, les produits laitiers. L'additionnement d'une quantité de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de la vancomycine, au moment d'isolement, est indispensable car sont les seules à résister à une concentration pareille par ce fait les autres bactéries lactiques seront éliminées au moment de croissance (Mathot et al., 1994).

La présence des leuconostocs dans les différentes écosystèmes utilisés dans cette thèse (lait de chamelle, lait de chèvre, lait de brebis, fromage bleu, ensilage et miel) sont conformes aux plusieurs études ayant montré que ces bactéries ont été aussi trouvées dans les laits, les produits laitiers, le miel, les végétations vertes, les racines des plantes et même chez l'homme (sang, urée, vagin et lait maternel) (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004, Hemme, 2012, Budge et al., 2016).

L'identification des espèces a été conduite selon les résultats obtenus des tests physiologiques et biochimiques comme la croissance à différentes températures, différents pH et différentes concentrations de NaCl ainsi que certains caractères biotechnologiques comme l'utilisation de citrate et la production d'acétoïne et cela en se basant sur la comparaison avec les tableaux et les schémas d'identification des espèces de *Leuconostoc* (Milliere et al., 1989, Villani et al., 1997, Björkroth et Holzapfel, 2006). Selon ces derniers, on a pu identifier deux sous-espèces : *mesenteroides* et *dextranicum* appartenant à l'espèce *Leuconostoc mesenteroides*.

La confirmation de l'identification phénotypique a été réalisée aussi par l'étude du profil fermentaire en présence de différentes sources hydrocarbonées des vingt-huit isolats en établant

la gamme classique et la galerie API 50 CHL. Li et al. (2015) ainsi que Jung et al. (2012b) ont pu identifier plusieurs bactéries lactiques, y compris ce genre, de façon adéquate. Toutefois certaines bactéries sont mal identifiées phénotypiquement pour diverses raisons (Denis et Ploy, 2007). Une identification basée exclusivement sur des caractères phénotypiques peut donc mener à un résultat erroné. Par ailleurs, la biologie moléculaire simplifie dans ce cas l'identification (Petti et al., 2005). Dans ces situations, l'amplification et le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S suivi de la comparaison de la séquence obtenue à des bases de données ont démontré leur efficacité pour l'identification bactérienne. Il s'agit d'une méthode universelle, précise et objective, dont la variabilité est limitée par rapport aux techniques conventionnelles (Reller et al., 2007).

La PCR universelle ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S, La partie d'ADN la plus communément utilisée pour la taxonomie bactérienne, à l'aide d'amorces universelles, a d'abord été développée pour des études phylogénétiques. En effet ce gène est universellement retrouvé chez les bactéries et sa fonction est conservée. Il est composé d'environ 1500 nucléotides (Lewin et Sanlaville, 1998). Des travaux préliminaires ont pu montrer que l'ADNr 16S code pour un ARN ribosomal de fonction constante dans l'évolution ; ce gène peut donc servir d'horloge moléculaire pour suivre les changements dans l'évolution bactérienne. Les séquences de ce gène ont ainsi joué un rôle majeur dans l'étude de la phylogénie et de la taxonomie bactérienne (Dworkin et al., 2006).

Vu le potentiel d'exactitude d'identification assez important offert par le séquençage de ce gène, un grand nombre de bactéries lactiques y compris les espèces de *Leuconostoc* ont été identifiés par cette méthode (Balcázar et al., 2007, Li et al., 2015, Park et al., 2010, Lacerda et al., 2011, Jung et al., 2012a).

L'usage des banques de données est une étape incontournable dans ce genre de démarche afin de tirer le maximum d'informations et afin de mener une étude remplissant les conditions de rigueur nécessaires à une bonne identification des bactéries (Clarridge, 2004). Pour cela, les séquences des amplicons de la PCR du gène ADNr 16S de nos souches ont été comparés avec les séquences de la banque électronique GenBank via le Blast. Le résultat a montré une ressemblance de 99% avec l'espèce *L. mesenteroides* dont des pourcentages de similarité supérieurs à 99% avaient été choisis pour assimiler une souche à une espèce déjà décrite (Denis et Ploy, 2007).

Dans le but de classer les souches isolées préalablement au niveau de leur espèce, une analyse moléculaire a été conduite en se basant sur les distances entre les séquences du gène conduisant

à la construction d'arbre phylogénétique par la méthode de Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987). Les résultats de l'analyse phylogénétique (Fig. 36) ont indiqué que toutes les souches, isolées à partir des différents écosystèmes, ont été placées dans le même groupe avec la souche *L. mesenteroides* RTF10, ceci a confirmé leur identité phylogénétique avec une valeur de bootstrap de 99%. Cependant, *L. lactis* KCTC 3528 a été placée séparément par rapport aux souches de *L. mesenteroides* avec une courte distance en raison de leur similarité génétique élevée. La souche *Lb. sakei* a été séparée par une grande distance, ce qui reflète leur dissemblance.

Les résultats de l'identification de la sous-espèce *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* par PCR ont révélé que dix-sept souches parmi vingt-huit appartiennent à cette espèce. Ces résultats sont conformes avec ceux de Moschetti et al., 2000, réalisés sur les souches de *Leuonostoc* isolées à partir de différentes sources telles que la pizza, les herbes de campagne, les cultures de lactosérum naturelles, le fromage mozzarella et les saucisses. Les mêmes travaux ont été publiés ultérieurement (Seseña et Palop, 2007, Coppola et al., 2006). Selon la taxonomie des *L. mesenteroides* (Hui et Evranuz, 2016), les onze souches restantes peuvent appartenir à la subsp. *dextranicum*, subsp. *suionicum* et non pas à la subsp. *cremoris*, car cette dernière présente un profil fermentaire très réduit, contrairement aux profils obtenus par nos souches isolées.

Dans l'ensemble, on peut constater une grande similitude des résultats quelle que soit la méthode d'identification employée, ce qui nous conforte dans la pertinence et la rigueur de nos analyses phénotypiques.

D'autre part, le choix de la méthode d'identification doit être soigneusement analysé en prenant en considération plusieurs facteurs, tels que l'origine des échantillons (aliments ou isolats cliniques), le nombre d'isolats à identifier et le personnel qualifié. Vu que la plupart des études d'isolement et d'identification des BL visent à détecter les isolats bioprotecteurs potentiels, l'approche moléculaire reste la plus sensible et la plus sûre (Moraes et al., 2013).

En outre, les souches de leuconostocs ont été aussi analysées par une électrophorèse des protéines solubles en conditions dénaturantes et cela pour comparer le profil protéique, analysé sur un gel de séparation de 12% des bactéries cultivées dans les mêmes conditions mais isolées de différents écosystèmes. Les résultats obtenus ont montré que le taux de similitude entre les différents profils varie entre 85,29% et 100%. Le profil de la souche E14, isolée d'ensilage, était plus proche aux profils des souches isolées de laits (lait de brebis, lait de chèvre et lait de chamelle) que ceux des souches isolées de fromage bleu et miel. On n'a pas pu identifier les sous-espèces de *L. mesenteroides* en utilisant l'analyse protéique. Ces résultats se concordent

et ceux trouvés par Dicks et al., 1990 qui ont montré des niveaux de parenté chez souches de *O. oenos*, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *L. paramesenteroides* et *L. lactis* en effectuant une analyse numérique informatisée des protéines cellulaires totales solubles, des compositions de base d'ADN et des données d'hybridation de DNA/DNA. Plusieurs recherches ont prouvé que les profils de protéines semblaient appropriés pour la discrimination des espèces, mais ne se sont pas distingués entre les sous-espèces de *L. mesenteroides*. Kim et al. (2002, 2003), aussi, ont réalisé une étude pour évaluer l'utilité de l'empreinte protéique pour l'identification des BL isolées de Kimchi en ayant effectué une analyse par SDS-PAGE des protéines totales. Ces dernières ont donné des traces de bandes différentielles très spécifiques entre les différentes espèces de BL, y compris les espèces de *Leuconostoc*, ce qui le rendait possible à identifier. En comparant les résultats avec ceux du profil fermentaire API 50 CHL et du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, ils ont démontré que le SDS-PAGE des protéines totales est une méthode spécifique et fiable qui sera utile pour l'identification des BL au niveau de l'espèce et peut être utilisée comme méthode d'identification alternative ou complémentaire pour clarifier les résultats physiologiques ambigus. Cette conclusion a été confirmée par autres auteurs Pérez et al., 2000 ; Jung et al., 2012a ; Sánchez et al., 2003 ; Ghazi et al., 2009 et Han et al., 2014.

Des méthodes récentes comme la spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF) ont été récemment intégrées dans le flux de travail du laboratoire de microbiologie pour une identification rapide et à faible coût des espèces microbiennes. Cette méthode identifie rapidement et avec précision la plupart des espèces bactériennes d'importance clinique et voire agro-alimentaire en analysant le spectre de masse à partir de cellules bactériennes entières. Les profils de masse bactérienne sont dérivés de protéines bactériennes ribosomales ou autres abondantes qui pourraient être utilisées comme biomarqueurs pour la discrimination de sous-espèces (Sauget et al., 2017).

2- Propriétés technologiques des souches de *Leuconostoc*

L'activité protéolytique des bactéries lactiques occupe une place capitale lors de la croissance de ces dernières dans le lait et contribue fortement dans le développement des propriétés organoleptiques de différents produits laitiers fermentés (Smid et Kleerebezem, 2014). Pour cela, nous avons testé la capacité des nos souches à hydrolyser la caseine du lait en employant le lait écrémé à différentes concentrations. On a constaté que sans exception, toutes les souches testées ont exprimé une activité protéolytique mais avec des niveaux variables. Selon

Vuilleumard (1986), la souche est dite protéolytique si elle présente une zone de lyse de diamètre est supérieur à 5 mm. Par comparaison à cette donnée, nos souches sont révélées protéolytiques dont les souches isolées à partir des produits laitiers et ensilage ont présenté une activité assez semblable, tandis que la souche isolée du miel M67 a montré une faible activité. Plusieurs auteurs classent les espèces du genre *Leuconostoc* comme des bactéries peu protéolytiques qui utilisent peu de protéines pour la croissance, ce qui entraîne une croissance limitée dans le milieu lait, de ce fait, elles se trouvent obligées d'utiliser les acides aminés et de les peptides présents à l'extérieur (Hemme, 2012). Néanmoins, l'incubation de certaines souches de *Leuconostoc* dans le lait indique une protéolyse de caséine, en changeant le goût et la texture finale. Leur activité est probablement liée à une certaine lyse des cellules qui libèrent les enzymes protéolytiques internes comme il était suggéré par Alegria et al. (2013) dans une étude menée sur des *Leuconostoc* isolée des produits laitiers. Nos résultats sont en accord aussi avec ceux obtenus par Idoui et Karam, (2008) et Tulini et al. (2015), qui ont trouvé que les bactéries lactiques, isolées à partir du beurre de vache traditionnel de la région de Jijel, présentent un caractère protéolytique. Le système protéolytique de BL comprend trois composantes principales : (i) la protéinase liée à la paroi cellulaire qui déclenche la dégradation de la caséine extracellulaire en oligopeptides, (ii) les transporteurs de peptides qui absorbent les peptides dans la cellule et (iii) diverses peptidases intracellulaires qui dégradent les peptides en peptides et acides aminés plus courts. Ces derniers aussi peuvent être transformés en divers composés gustatifs, comme les aldéhydes, les alcools et les esters (Liu et al., 2010). La production d'un produit alimentaire fermenté de haute qualité dépend en partie du système protéolytique des bactéries starters, puisque les peptides et acides aminés formés ont un impact direct sur l'apparition des saveurs dans ces produits transformés. Chez ces bactéries y compris les leuconostocs, plusieurs peptidases intracellulaires de spécificités variables ont été rapportées, et leurs libérations après lyse cellulaire a été évoqués pour jouer ce rôle recherché dans les produits laitiers fermentés (Liu et al., 2008, Smid et Kleerebezem, 2014).

La saveur caractéristique des produits alimentaires peut également être due à la lipolyse comme la protéolyse dont l'incorporation d'enzymes lipolytiques et/ou protéolytiques accélère la formation d'arôme. La lipolyse génère des acides gras libres et il est nécessaire d'avoir une forte concentration de ces composés pour produire un effet perceptible sur la saveur du produit (Hollet et al., 2005). Le métabolisme des acides gras libres génère de nombreux composés responsables de l'arôme et de la texture tels que les esters, les lactones, les méthyl cétones, les alcools et les acides (Toldrá et al., 2001).

D'après les résultats obtenus, il apparaît que plus que la moitié des souches de *L. mesenteroides* ont présenté une activité lipolytique en se révélant positives avec des dépôts autour des spots de croissance et cela vis-à-vis les deux sources lipidiques naturelles et artificielles. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Katz et al. (2002) qui ont montré que les espèces de *L. mesenteroides*, isolées du lait de brebis et des fromages, ont pu hydrolyser la tributyrine qui est un triglycéride naturellement présent dans le beurre et aussi avec les travaux de Tanasupawat et al. (2015) ou ils ont montré que les espèces de *L. fallax*, isolées des produits de viande fermentés thaïlandais, ont présente une activité lipolytique importante. Plusieurs recherches ont montré que les BL sont considérées comme faiblement lipolytiques par rapport à de nombreux autres groupes de bactéries comme *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Achromobacter*. Les estérases provenant des bactéries lactiques et des levures peuvent être impliquées dans le développement de saveurs fruitées dans les aliments et de la saveur typique dans le fromage italien (McKay, 1993). Les lipases microbiennes et les estérases peuvent améliorer la qualité ou accélérer la maturation des fromages et des saucisses fermentées (Medina et al., 2004). La plupart des BL ne possèdent que des estérases intracellulaires, par conséquent, la plupart des estérases de BL ne peuvent pas hydrolyser les lipides alimentaires jusqu'à leur libération des cellules lysées. Cette activité enzymatique varie en fonction de la nature des lipides présents et de leur degré de pré-hydrolyse (Thierry et al., 2016). Différents arômes désagréables produits par les BL peuvent également être attribués à une activité de lipolyse telle que rance, butyrique, amère, impure, savonneuse et astringente (Barreto Penna et al., 2015).

Les leuconostocs sont utilisés dans l'industrie laitière pour leur capacité à produire du CO₂ et des composés d'arôme tel que le diacétyle et cela grâce au co-métabolisme sucre/citrate (Bourel et al., 2001, Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004). Pour cela, nos expériences ont été menées sur un milieu spécifique possédant les deux substrats. Les résultats ont montré que toutes les souches mises en test sont capables de cométaboliser le citrate avec le glucose, ce qui concordent avec les travaux réalisés par Marty-Teyssset et al. (1996). Le même milieu a été utilisé par Drici et al. (2010) et Medina de Figueroa et al. (2000) pour tester la capacité des souches de *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* et dix-sept espèces du genre *Lactobacillus*, respectivement, à métaboliser le citrate. En plus, il a été démontré par Schmitt et Divies, (1991) le rôle important de l'acide citrique dans les voies énergétiques et le catabolisme du lactose.

Le transport de citrate à travers la membrane est effectué par la citrate perméase P (CitP), pour l'échange de la forme dianionique du citrate et des anions de lactate produits lors du

cométabolisme sucre/citrate et elle est même utilisée pour soulager le stress dû aux niveaux élevés d'oxaloacétate Pudlik et Lolkema (2012). La PCR du gène partiel codant pour la protéine clé du métabolisme du citrate CitP par l'amplification de la partie conservée en utilisant l'ADNp des souches de *L. mesenteroides* isolées localement ainsi que les deux souches références *W. paramesenteroides* J1 et *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CRL 264, utilisées comme références dans ce présent travail, a généré des amplicons individuels de taille proche de 0,8 kpb, ce qui nous concorde avec l'aspect phénotypique. Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux qui ont montré que, chez les lactocoques et les leuconostocs, le métabolisme du citrate nécessite l'action de la citrate perméase P qui transporte ce substrat vers le cytoplasme bactérien et qui est codée par un gène plasmidique (Kempler et McKay, 1981 ; David et al., 1990 ; Sesma et al., 1990 ; Gasson, 1997,) et leurs gènes ont été séquencés et se sont révélés très homologues (David et al., 1990 ; Vaughan et al., 1995 ; Bandell et al., 1998). Dans ce sens, Medina de Figueroa et al., 2000 ont démontré que les souches de lactobacilles n'avaient pas de gène plasmidique *citP* équivalent à celui des genres cités précédemment.

Magni et al. (1994) ont signalé que la transcription chez *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CRL 264 ne dépendait pas de la présence de citrate. Les deux groupes, espagnol sous la direction de Dr. Lopez et argentin sous la direction de Dr. de Mendoza ont rapporté ultérieurement que le système de transport de citrate de *Lc. lactis* CRL 264 est induit par un stress acide (Garcia-Quintans et al., 1998). Chez *L. mesenteroides*, la CitP est inductible par la présence de citrate (Marty-Teyssset et al., 1996). Le gène codant pour la citrate perméase est localisé sur un plasmide de 23 kb dans *L. mesenteroides* et sur le chromosome chez *L. lactis* (Hemme, 2012). Kihal et al., 1996 ont pu montrer que le phénotype Cit⁻ chez *L. mesenteroides* était lié à la perte de plasmides de 22 à 23 kb. Tandis que l'utilisation de citrate chez *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* était constamment liée à un plasmide de 8 kb (Kempler et McKay, 1979 ; Sesma et al., 1990). Mtshali et al., 2012 n'ont détecté aucun gène *citP* dans toutes les souches de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* testées, provenant d'échantillons de raisins et de vins sud-africains.

L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques. D'après les résultats obtenus, on a remarqué que la totalité des souches mises en test ont présenté une production progressive en acide lactique durant une incubation de 24 h. Cette dernière est accompagnée d'un abaissement du pH du milieu. Pour savoir la variation du pouvoir acidifiant entre la même espèce, six souches représentatives ont été choisies à partir de six écosystèmes.

La représentation des résultats nous a montré deux groupes : le groupe (GI) ayant une rapide et forte acidification et qui rassemble les souches CM9, GM2, SM34 et F9 isolées des laits et des produits laitiers et le groupe (GII) caractérisé par une acidification moins rapide rassemble les souches E14 et M67 isolées d'ensilage et du miel, respectivement (Fig. 32).

L'évolution de l'acidité dornic a été inversement proportionnelle à la diminution du pH, puisque la quantité de l'acide lactique produit dans le lait supplémenté avec 0,3% d'extrait de levure, mesurée par l'acidité dornic, est reflétée dans la mesure du pH du milieu d'où vient la relation étroite et leur rôle complémentaire exprimé dans la cinétique dont, après deux heures d'incubation, les valeurs de pH varient entre $6,71 \pm 0,07$ pour GI et $6,79 \pm 0,05$ pour le GII. En parallèle la quantité de l'acide lactique produite se situe entre $2,3 \pm 0,07$ g L⁻¹ et $1,95 \pm 0,06$ g L⁻¹ d'acide lactique par litre de lait, pour le GI et GII, respectivement. Au bout de 24 h d'incubation ces valeurs de pH ont diminué et se sont trouvées situer entre un pH de $5,16 \pm 0,01$ et de $5,71 \pm 0,07$, de même la quantité de l'acide lactique produite se situe entre $5,3 \pm 0,19$ g L⁻¹ et $3,95 \pm 0,12$ g L⁻¹, pour le GI et GII, respectivement. On a choisi d'ajouter cette concentration d'extrait de levure pour lancer la cinétique puisque dans un autre travail (Zarour et al., 2012), on a étudié l'effet de la concentration de l'extrait de levure (0,1%, 0,3% et 0,5%) sur la croissance de *L. mesenteroides* en culture pure dans le milieu lait et on a remarqué que l'addition de 0,3 % de ce facteur de croissance dans le milieu lait favorise plus la croissance des leuconostocs et par conséquent, la production de ses métabolites, en particulier, le CO₂ et le lactate.

Nos résultats se concordent et ceux trouvés par Benmechernene et al. (2013) qui ont rapporté une activité acidifiante presque similaire des espèces de *L. mesenteroides* isolées à partir du lait de chamelle. Cependant, Kihal et al. (2009) ont détecté une production moins forte d'acide lactique en culture pure en employant *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (0,9 g L⁻¹) et une production plus forte issue de la synergie en culture mixte avec *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (3,42 g L⁻¹) en milieu lait sans extrait de levure, ce qui explique leur bonne performance dans les industries laitières. De même Kihal et al. (2006) ont noté une activité acidifiante de *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* de 2,25 g dans 1 L de lait écrémé supplémenté avec 0,1% d'extrait de levure durant la cinétique de production des métabolites en hétérofermentation, principalement le dioxyde de carbone. La différence d'acidité entre les souches isolées des produits laitiers et les souches isolées du miel et d'ensilage est peut-être due à plusieurs facteurs comme habitat original, la saison de collection des échantillons, le processus de production et de fermentation et du bagage enzymatique de la souche elle-même. Aucune étude d'acidité n'a été faite en utilisant des souches de leuconostocs isolées à partir du

miel jusqu'à maintenant, par contre, plusieurs recherches ont été établies en utilisant l'ensilage comme matière première, Ni et al. (2015) ont étudié l'effet de la présence et l'absence des BL notamment les bactéries hétérofermentaires du genre *Leuconostoc* sur la fermentation du blé d'hiver qui est une culture adaptée à être ensilée pour l'alimentation animale en Chine et cela au cours du processus d'ensilage, ou ils ont vu clairement l'importance de la production des acides sur la qualité du fourrage. Ce qui était confirmé par Wang et al. (2017) qui ont montré l'effet de la forte production d'acide lactique et l'acide acétique par les BL sur la qualité de fermentation d'ensilage italien.

Les plasmides sont des molécules d'ADN double brin qui contrôlent leur propre maintien par réplication. Plusieurs plasmides de nature différente peuvent coexister dans la même cellule (Leblond-Bourget et Guedon, 2009). Les plasmides ne sont, en général, pas indispensables aux bactéries mais elles peuvent conférer des propriétés importantes voire vitales telles que la capacité à utiliser certains substrats de croissance ou à répondre à des stress environnementaux et même des métaboliques importantes comme l'utilisation du lactose, l'activité protéolytique extracellulaire, l'utilisation du citrate (Drider et Prévost, 2009).

Les profils plasmidiques des souches de *L. mesenteroides* CM30, CM70, CM9 et SM34, isolées de lait de chamelle et lait de brebis, a révélé la présence d'un à quatre plasmides avec une taille entre 7,53 et 46,83 kbp (Fig. 47). Par contre, la souche *L. mesenteroides* RTF10, isolée du produit carné, a présenté un profil distinct des autres avec deux à cinq plasmides dont le plus petit avait une taille de 1,74 kpb. On peut pas corrélérer le nombre de bandes apparues sur le gel avec le nombre exacte des plasmides parce qu'il pourrait qu'un seul plasmide se présente sous trois formes, la forme superenroulée, la forme relâchée et la forme linéaire (Hintermann et al., 1981). Nos résultats sont en accord avec ceux de Jung et al. (2012b) qui ont trouvé quatre plasmides avec une taille qui varie entre 21,99 et 40,16 kpb chez *L. carnosum* isolée à partir de Kimchi. De même Flórez et al. (2016) a révélé la présence d'au moins trois plasmides chez *L. mesenteroides*. Aussi, selon Agarwal et al. (2014), les souches de *Leuconostoc sp.*, isolée des carottes, possédaient six plasmides avec des poids moléculaires qui varient entre 1,5 et 10 kpb. Tandis que Kihal et al. (1996) ont révélé sept plasmides chez *L. mesenteroides* avec une taille entre 3 et 55 kbp. La variabilité du nombre et de la taille des plasmides au sein de la même espèce est liée étroitement avec l'instabilité de ces ADN extrachromosomiques, leur présence varie selon l'origine de la souche, conditions de croissance et de culture et même les conditions d'extraction ou on peut perdre des plasmides (Havkin-Frenkel et Dudai, 2016).

3- Polysaccharides produits par les BL

Les EPS produit par BL possèdent de nombreuses propriétés technologiques (Agissant principalement comme épaississants, stabilisants et émulsifiants) qui ont conduit à l'utilisation de bactéries productrices pour améliorer les propriétés rhéologiques et organoleptiques des produits fermentés par la production de ces biopolymères (Werning et al., 2012 ; Pérez-Ramos et al., 2015).

En outre, il existe des études *in vitro* et *in vivo* qui montrent certains effets bénéfiques des EPS sur la santé, ce qui en fait des candidats appropriés pour l'utilisation dans le développement d'aliments fonctionnels (Patel et al., 2013 ; Ryan et al., 2015).

La quantification des EPS présents dans les surnageants des cultures bactériennes nécessite pour leur récupération une précipitation préalable, généralement avec de l'éthanol. Ensuite, sa concentration est déterminée par la méthode phénol-sulfurique, consistant l'hydrolyse des polymères par le traitement avec du phénol et l'acide sulfurique et la détection spectrophotométrique subséquente des monosaccharides neutres générés (Dubois et al., 1956). Les milieux complexes tels que MRS, habituellement utilisés pour la croissance des BL, contiennent de l'extrait de levure et des glucomannanes présents sur la paroi de ces organismes, sont des polysaccharides et précipitent également avec de l'éthanol. Par conséquent, afin d'éviter les interférences de certains composants de tels les milieux complexes, dans ce travail, le milieu CDM avec du saccharose comme source de carbone a été utilisé pour la croissance bactérienne (Notararigo et al., 2013). Parmi plusieurs travaux établis, Nacher-Vázquez et al. (2017), a montré que les souches de *L. mesenteroides* n'ont pu produire des EPS en présence de glucose, comme seule source de carbone.

Dans ce milieu, les niveaux de production ont varié entre 0,55 et 3,52 g L⁻¹, dans des conditions de croissance discontinues, sans contrôle du pH et avec une concentration initiale de saccharose de 57,5 mM (Fig. 36). Ces résultats concordent avec ceux de Notararigo et al. (2013) et Nacher-Vazquez et al. (2015).

De plus, cette haute production de EPS par les souches de *L. mesenteroides* pourraient être améliorée en optimisant les conditions de culture (dans les fermenteurs, au pH contrôlé et les facteurs de modification tels que la température, les nutriments, le temps de production et la concentration de saccharose), car on a constaté que d'autres BL pouvaient atteindre des niveaux de production de plus de 10 g L⁻¹ (Rühmkorf et al., 2013).

Il convient de noter que bien que les niveaux de production EPS dépendent du type de polymère, de la production de bactérienne et des conditions de culture, en général, les valeurs très élevées

sont caractéristiques des α -glucanes, puisque la production d'autres HoPS comme β -glucanes et HePS est beaucoup plus faible, dans la gamme de 100-200 mg L⁻¹ et 20-500 mg L⁻¹, respectivement (Ruas-Madiedo, 2009 ; Werning et al., 2012 ; Notararigo et al., 2013).

Pour une étude approfondie des EPS produits par les souches de *L. mesenteroides*, les souches CM9, CM30, CM70, isolée du lait de chamelle, et SM34, isolée de lait de brebis, ainsi que RTF10 et *Lb. sakei* MN1, isolées à partir de produits carnés réfrigérés et emballés sous vide après un stockage prolongé (Chenoll et al., 2007) ont été sélectionnées, pour leur capacité à produire un EPS sur milieu saccharosé. Chez les cinq souches, cette production a été détectée par : (i) la culture de bactéries dans un milieu liquide ce qui a permis leur quantification en utilisant la méthode phénol-sulfurique, (ii) la culture des bactéries en milieu solide et (iii) la détection directe des EPS par microscopie électronique. La sélection des souches de *Leuconostoc*, isolées localement, a été aussi faite en se basant sur leurs aptitudes technologiques.

La détection des colonies muqueuses a été utilisée comme test phénotypique pour sélectionner des bactéries productrices des EPS (Patel et al., 2011). En outre, on a précédemment détecté la production de dextrane dans un milieu solide contenant du saccharose (Nácher-Vázquez et al., 2017). Ainsi, la capacité des cinq BL à produire EPS a été analysée dans des milieux solides MRS contenant du 2% saccharose ou 2% glucose. Nos résultats ont confirmé l'absence de production des EPS en présence de glucose (Fig. 37). En revanche, on a détecté deux phénotypes différents des colonies pendant l'incubation pendant 120 h : (i) colonies plates avec une faible adhérence à la gélose apparues entourées d'un gel semi-liquide, et étendues sur la plaque à des durées d'incubation plus longues, et (ii) colonies convexes adhérentes fermement à la gélose. Ce dernier phénotype, observé pour les colonies CM30, RTF10 et SM34, pourrait être lié à la synthèse ou à la génération des EPS de faible poids moléculaire (<10⁴ Da), perdus durant la purification. Fort possible que ces bactéries pourraient être capable de synthétiser les dextranases, puisque quelques souches de *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* possèdent cette activité enzymatique (Mahmoud et al., 2014), qui n'a pas encore été attribuée à un gène séquencé. Par conséquent, si tel est le cas, ces BL pourraient, non seulement, synthétiser le dextrane, mais aussi le dégrader plus tard pour l'utiliser pas uniquement comme source de carbone, mais aussi pour développer leur niche par leur croissance planctonique.

La détection par microscopie électronique à transmission des bactéries productrices des EPS a déjà été utilisée par d'autres groupes de recherche (Fanning et al., 2012 ; Dertli et al., 2013). Dans ces études, des cultures cultivées en milieu liquide ont été utilisées, qui ont été

préalablement sédimentées par centrifugation. Cette manipulation, dans le cas des EPS capsulaire ou étroitement liés à la surface cellulaire, n'a aucun effet sur le type des échantillons, mais dans le cas des EPS produits par les leuconostocs, la plupart des molécules liées aux bactéries ont été éliminées après la centrifugation conjointement avec le surnageant ou lors de la remise en suspension des cellules (résultats non représentés). Par conséquent, dans ce travail, une méthode de détection directe de EPS provenant de colonies bactériennes cultivées en milieu solide a été développée. De cette façon, il a été possible de minimiser la perte d'EPS lors de la manipulation des échantillons, permettant la détection et la localisation du EPS associé à la paroi bactérienne ou entourant les cellules. Nous croyons que cette méthode de préparation des échantillons pour étude ultérieure par microscopie électronique à transmission, n'a pas été décrite dans la littérature jusqu'à maintenant. L'analyse a révélé, seulement en MRSS, des bactéries entourées des molécules liées sous forme d'un réseau en ayant possédé le même aspect que les préparations de dextrane seul. En outre, la méthode, utilisée ce présent travail pour pouvoir assurer une observation microscopique précise des colonies des leuconostocs, au MET, a été créée et utilisée par notre laboratoire pour la localisation des EPS des souches de *L. mesenteroides* RTF10 et *Lb. sakei* MN1, en utilisant la méthode de «Sandwich» (Nácher-Vázquez et al., 2017).

Les EPS sont synthétisés par les souches de *Leuconostoc* extracellulairement, dans une réaction catalysée par les enzymes spécifiques, les glucane-saccharases comme les dextrane-sacarases, les alternane-saccharases ou les fructane-saccharases comme levane-saccharases, en utilisant le saccharose comme substrat et générant dans chaque réaction comme produit de son hydrolyse : (i) une molécule de fructose, qui peut être utilisée comme source de carbone par certaines bactéries (Barrière et al., 2005), pour substrat transitoire pour la production de mannitol (Wisselink et al., 2002) et il est utilisé pour former l'HoPS type levane (Han et al., 2016) et (ii) une molécule de glucose, ce qui peut être utilisé pour l'allongement des molécules de dextrane ou pour la glycolyse. Pour cette raison, une analyse métabolique des surnageants (en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) avec la quantification des niveaux de production des EPS (en utilisant la méthode phénol-acide sulfurique) était appropriée pour analyser et comprendre l'interrelation entre la consommation du saccharose, la production des produits intermédiaires et finaux des souches de *L. mesenteroides* et *Lb. sakei* MN1.

L'étude métabolomique a montré que toutes les souches consommaient le saccharose et produisaient les EPS avec des niveaux différents, ont accumulé du fructose dans le milieu de

culture (Fig. 39). Aussi elles ont commencé à métaboliser le fructose à la fin de la phase exponentielle. L'atteinte du sommet de cette accumulation est liée de façon étroite avec la consommation totale de substrat principal (environ 6-9 h) et ont continué avec la production d'acide lactique. Sauf la souche CM70 qui a atteint la consommation totale du saccharose après 17 h d'incubation. Ce comportement de l'accumulation de fructose et de sa consommation subséquente après l'épuisement du saccharose a déjà été décrit dans d'autres souches produisant du dextrane cultivé en milieu avec du saccharose (Dols et al., 1997 ; Quirasco et al., 1999 ; Santos et al., 2000).

Toutes les souches de *L. mesenteroides* mises en test, étaient capables de consommer le fructose et produire le mannitol, un polyol avec plusieurs effets bénéfiques (antioxydant, édulcorant non métabolisable). Les bactéries lactiques produisant du mannitol peuvent être directement appliquées dans la fabrication d'aliments fonctionnels et cela peut conduire à des produits alimentaires fermentés avec une valeur nutritive supplémentaire (Wisselink et al., 2002). On a remarqué que le début de la consommation du fructose coïncide avec le début de la production de ce polyol avec des taux qui varient entre une souche et une autre. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par plusieurs chercheurs (Soetaert et al., 1999 ; Yun et Kim, 1998 ; von Weymarn et al., 2002 ; Patra et al., 2011 ; Zahid et Deppenmeier, 2016).

En plus des différences dans la consommation de fructose, les souches ont montré différents modèles d'utilisation du glucose générés par l'hydrolyse du saccharose. Alors que dans les cultures des souches de *L. mesenteroides* de CM9, CM30, SM34 et CM70 aucune accumulation de glucose n'a été détectée. En revanche, la même espèce, RTF10, la présence de glucose a été détectée entre 7-10 h, la chose qui n'a pas pu être détectée dans le milieu de culture *Lb. sakei* MN1. Les souches de *L. mesenteroides* isolées des laits avaient un comportement identique que celui de la souche de *Lactobacillus*, isolée des produits carnés. Cette différence est probablement liée aux niveaux de production des EPS de chaque souche.

Concernant la production de EPS, en valeurs absolues correspondait à la dynamique de croissance observée pour chacune des souches. Le rythme de croissance est une caractéristique dépendant de la souche. Ainsi, certaines souches de *Leuconostoc* (Dols et al., 1997) et *Lactobacillus* (Rühmkorf et al., 2013) ont une efficacité maximale pendant la phase exponentielle de croissance. Cependant, dans le cas de *Lb. reuteri* 121, cette souche a atteint sa production maximale à la fin de la phase exponentielle de croissance, tandis que *Lb. reuteri* 180 a continué de produire EPS au cours de la phase stationnaire de croissance (van Geel-Schutten et al., 1998).

Pour cette raison et afin de déterminer l'efficacité de la synthèse EPS, on a calculé la production relative de biomasse dans la culture (concentration EPS / A_{600nm}) (résultats non démontrés). Ainsi, on a constaté que *Lb. sakei* MN1 a atteint son efficacité de production maximale pendant la phase exponentielle, tandis que les souches de *L. mesenteroides* ont maintenu leurs niveaux de production constants pendant les phases de croissance exponentielle et stationnaire.

La différence entre les modèles de production de EPS est influencée par différents facteurs, y compris la capacité d'acidification du milieu de culture due à la production d'acide lactique par les BL et au pH optimal de l'activité enzymatique responsable de la synthèse de l'EPS (Rühmkorf et al., 2013). L'analyse du pH du milieu extracellulaire et de la production d'acide lactique a révélé que *Lb. sakei* MN1 a eu un effet acidifiant plus élevé que les autres souches de *Leuconostoc*, ainsi qu'une plus grande capacité de production de l'acide lactique en valeurs absolues. La production d'acide lactique chez la souche CM70 a été plus élevée parmi les souches de *Leuconostoc* et cela est due à son incapacité à synthétiser les EPS, ce qui signifie que le taux de glucose produit sera converti directement en acide lactique.

Enfin, on a estimé l'efficacité des glucane-saccharases pour la synthèse *in vivo* des EPS, exprimant leur concentration en molécules de glucose. Dans le cas de *Lb. sakei* MN1, après 13 h de culture, la production était de 12 mM et, en partant d'une concentration initiale de saccharose dans le milieu de 22 mM, ce résultat indiquait que, apparemment, 54% du glucose libéré par hydrolyse du saccharose a été utilisé pour la synthèse du EPS. Ce pourcentage a varié entre 16% pour la souche CM9 et 60% pour la souche SM34. Le manque de détection de glucose dans les surnageants des souches de CM9, CM30, SM34, CM70 et MN1 pourrait être dû à l'utilisation du saccharose pour la synthèse des EPS et au transport efficace du surplus de sucre à l'intérieur pour être utilisé dans la glycolyse. L'accumulation de glucose dans les cultures de la souche RTF10 indique que le glucose est transporté vers le cytoplasme et principalement métabolisé par la glycolyse, car une augmentation de la production d'acide lactique pendant l'incubation durant la phase stationnaire a été observée par cette bactérie.

Les conditions de milieu et de culture influencent la synthèse de EPS et en conséquence, les niveaux de production, la masse moléculaire et la composition (Dueñas et al., 2003). En général, la performance de la synthèse EPS est supérieure dans les milieux plus complexes qui permettent d'atteindre des niveaux plus élevés de biomasse. Cependant, l'utilisation de tels moyens implique l'obtention de EPS avec un niveau plus élevé de contaminants (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005).

Par conséquent, dans ce travail, la production des EPS a été conduite dans le milieu défini CDM avec 0,8% de saccharose. Leur récupération des surnageants des cultures a été réalisée par la

précipitation avec un volume d'éthanol, suivi d'une purification par une dialyse et fractionnement chromatographique. Des concentrations de $2,15 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$; $3,14 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$; $1,47 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$; $1,25 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$ et $1,72 \pm 0,12 \text{ g L}^{-1}$, pour les souches de *L. mesenteroides* CM30, SM34, CM9, RTF10 et *Lb. sakei* MN1 avec un degré de pureté après purification de 99%.

La caractérisation des EPS produits par les souches de *Leuconostoc*, isolées en Algérie a indiqué que ce sont des HoPS (glucanes) type dextrane, pratiquement linéaire, constitués principalement par des molécules de glucopyranoside liées par des liaisons α -(1-6) (entre 85,3% et 89,4%) et partiellement ramifiés en position O-3 par une seule unité α -glucopyranose (entre 8,5 % et 10,3%) (Fig. 42-45). Par ailleurs, L'analyse de l'EPS MN1 a montré 97% de liaisons α -(1,6) avec 3% des substitutions en position O-3, alors que, l'EPS RTF10 a montré 91% liaisons α -(1,6) à 9% substitutions à la position O-3 (Nacher-Vazquez et al., 2015). Cette structure est très similaire au dextrane commercial le plus utilisé au niveau industriel, produit par *L. mesenteroides* NRRL B-512F, qui présente 95% de liaison α -(1-6) et 5% de ramification avec des liaisons α -(1-3). Les spectres infrarouges des EPS caractérisés dans ce travail, a donné des bandes caractéristiques des anomères α comprises entre $847\text{-}849 \text{ cm}^{-1}$ et $913\text{-}917 \text{ cm}^{-1}$.

Les dextranses sont synthétisés par les dextrane-saccharases et à partir de 14 séquences déposées dans la base des données NCBI, les oligonucléotides *dsrF* et *dsrR*, situés à l'intérieur de la région conservée codant pour le centre catalytique de ces enzymes, ont été conçus. Ces oligonucléotides non dégénérés nous ont permis de détecter les gènes *dsr* chez les différentes souches de *L. mesenteroides*.

Toutes les souches avaient possédé la partie la plus conservée du gène responsable de la production de dextrane, même la souche non productrice CM70. Le séquençage des amplicons a confirmé leur identité comme une dextrane-saccharase avec un pourcentage de 99% et cela en les comparant avec les séquences déposées dans les bases de données du gène *dsr* appartenant à différentes souches de *L. mesenteroides*. La réalisation de l'arbre phylogénétique nous a permis de conclure que la séquence de CM70 appartient à une famille distincte que celles des autres souches mises en test en ayant montré une forte similitude avec les gènes codant pour la DsrT de *L. mesenteroides* NRRL B-512F (Funane et al., 2000) et pour la DsrP de *L. mesenteroides* IBT-PQ (Olvera et al., 2007). De même, autres auteurs ont décrit des oligonucléotides dégénérés qui leur ont permis la détection de gènes codant pour les glucane-saccharases présents chez les BL appartenant au genre *Lactobacillus*.

Pour déterminer la masse moléculaire exacte, on a utilisé la SEC-MALLS en testant plusieurs EPS commerciaux (T10, T50, T2000), comme standards, La masse moléculaire des dextrans produits par les souches isolées de *L. mesenteroides* (EPS CM9, EPS CM30, EPS SM34 et EPS RTF10) ainsi que la souche *Lb. sakei* (EPS MN1) ont une masse moléculaire très élevée, comprise entre 1×10^8 et 5×10^8 Da (Fig. 46), en la comparant avec les dextrans commerciaux, principalement T2000, qui théoriquement avait possédé une masse de 2×10^6 Da, confirmé par RMN, par contre l'analyse par SEC-MALLS a déterminé une masse moléculaire de $1,33 \times 10^6$ Da (équivalent à T1000 et non pas à T2000). Les dextrans T10 et T40 ont confirmé leur masse moléculaire déjà décrite de $1,22 \times 10^4$ Da et $3,98 \times 10^4$ Da, respectivement. Cette variabilité de masse nous servira dans des études postérieures pour l'étude de leur bioactivité.

Parmi les propriétés des BL, la viscosité, qui contribue à la rhéologie des aliments tels que les produits laitiers et qui influent généralement sur les propriétés générales du produit fini, notamment, le goût, la texture et la stabilité. Ils peuvent cependant avoir des effets néfastes sur d'autres aliments tels que les boissons ou les produits à base de viande. Pour cela, il est important de comprendre le comportement des ingrédients qui le composent, comme les polymères, en étudiant leurs propriétés rhéologiques.

Ces caractéristiques ont permis de détecter et d'isoler les souches productrices des EPS à partir de produits alimentaires altérés, qui ont ensuite montré des propriétés bénéfiques. Par exemple, dans le cidre et le vin, l'altération produite par certaines bactéries, est due à la production d'un (1,3)- β -D-glucane avec des substitutions *O*-2. Ainsi, des souches productrices, telles que *P. parvulus* 2.6 (Fernández et al., 1996 ; Werning et al., 2006), avec des propriétés probiotiques (Fernández de Palencia et al., 2009) et leur EPS purifiés agissant comme prébiotique (Russo et al., 2012) et en tant qu'agent anti-inflammatoire (Notararigo et al., 2014) ont été isolés du cidre. L'analyse des données de la viscosité apparente (η) en fonction des taux de cisaillement (γ) ($1-500 \text{ s}^{-1}$), à $20 \text{ }^\circ\text{C}$, ont montré que tous les dextrans synthétisés par les BL isolées des laits algériens et des produits carnés espagnols possédèrent le même profil avec deux comportements rhéologiques différents qui varie avec la concentration des polymères utilisée. Le premier est le comportement Newtonien qui est noté à des concentrations assez basses (entre 0,4% et 1%), où la viscosité est stable (η_0) et indépendante des taux de cisaillement, comme déjà indiqué dans la partie résultats, tandis qu'à partir de ces concentrations, les dextrans ont changé de comportement vers le non Newtonien ou le pseudo-plastique, puisque leur viscosité apparente a diminué avec l'augmentation du taux de cisaillement. Ce qui leur qualifie à être utilisé comme des potentiels additifs alimentaires.

La pseudo-plasticité des solutions polymères a été expliquée comme conséquence de la destruction de la structure de gel faible causée par des interactions non covalentes entre les chaînes de polymère (Fang et al., 2004). Ce comportement a également été observé pour d'autres dextrans isolés de cultures bactériennes ou de certains dextrans hydrolysés commerciaux (McCurdy et al., 1994 ; Moosavi-Nasab et al., 2010 ; Kothari et al., 2015), et pour d'autres biopolymères, tels que le xanthane, un HePS anionique produit par des bactéries Gram négatif appartenant au genre *Xanthomonas* qui sont utilisées comme additifs alimentaires et modificateurs de rhéologie (Petri, 2015) ou des β -glucanes immunomodulateurs synthétisés par des BL (Velasco et al., 2009). La propriété pseudo-plastique contribue à améliorer les qualités sensorielles alimentaires et contribue également à la transformation des aliments, lorsque des taux de cisaillement différents peuvent être appliqués pendant le mélange, le versement et le pompage (Moreno et al., 2000) et même dans la stabilité des solides en suspension (Mudgil et al., 2014).

Les expériences rhéologiques ont également prédit d'autres propriétés des molécules de dextrane en examinant la dépendance à la concentration des viscosités spécifiques de « zéro cisaillement ». Cette relation peut démontrer la présence d'interactions entre les chaînes polymères en définissant la concentration critique (C^*), cette relation a montré que la viscosité newtonienne augmente avec la concentration de dextrane et que la concentration critique des cinq dextrans varie entre 0,5% et 1%. Au-dessous de cette concentration, la viscosité des polymères dépendait uniquement du nombre de molécules et au-dessus, la viscosité serait influencée, non seulement par le nombre de molécules, mais aussi par leurs masses moléculaires, le degré de ramification des polymères, la température et les interactions entre les chaînes, puisque les molécules commencent à se lier et à interagir entre elles (Agarwal et al., 2016).

De plus, il a été démontré que la concentration critique est inversement proportionnelle à la masse moléculaire des polysaccharides ce qui est cohérent avec la plupart des dextrans utilisés dans cette étude. Par exemple, le dextrane MN1 de $1,74 \times 10^8$ Da a montré une C^* de 1%, alors que RTF10 de $4,41 \times 10^8$ Da présentait un C^* de 0,65%, ce qui concorde avec autres travaux (Dong et al., 2000 ; Dong et al., 2001). Aussi, les valeurs de la pente b , issues de la même relation, varient entre 5,62 et 9,86. Divers travaux antérieurs ont montré que les polymères se présentent sous forme d'une bobine aléatoire avec des chaînes flexibles présentant des valeurs d'exposant b dans une gamme ≥ 5 , tandis que les valeurs inférieures reflètent des polymères rigides, Ces résultats sont en accord avec des recherches établies précédemment (Bohdanecký et Kovář, 1982 ; Velasco et al., 2009).

En outre, les résultats obtenus ont montré que la viscosité de solutions aqueuses à 3% (viscosité représentative du domaine concentré) varie entre 158 Pas et 13,44 Pas dont le dextrane MN1 a la viscosité la plus élevée, par contre, le dextrane CM9 possède la viscosité la plus basse. En comparant ces résultats avec les masses moléculaires de ces polymères, on peut en déduire que la viscosité n'est pas seulement influencée par la masse moléculaire, mais aussi par les mêmes paramètres déterminant la conductivité critique du polymère (Glöckner, 2008 ; Mezger, 2014).

D'autre part, pour étudier l'effet immunomodulateur des dextrans produits par les souches de *L. mesenteroides* et *Lb. sakei*, la lignée cellulaire THP-1 différenciée a été utilisée comme un modèle *in vitro* pour détecter la réponse immunitaire. L'effet biologique différentiel des EPS avec différentes gammes de masses moléculaires a été précédemment observé (Hidalgo-Cantabrana et al., 2012), car les HePS ayant des charges négatives et/ou des petites masses moléculaires qui ont pu agir comme stimulateurs forts/légers des cellules immunitaires, alors que les EPS à grande taille présentaient une faible stimulation. Ainsi, dans les essais d'immunomodulation de PMA-THP-1 par des dextrans produits et purifiés dans ce présent travail, on s'attendait à ce que le nombre de molécules de polymère diminue avec l'augmentation de la masse moléculaire, puisque la même concentration ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) a été utilisée pour tous les dextrans. Pour les dextrans commerciaux, une corrélation partielle entre leurs effets et leurs masses moléculaires a été observée, le T2000 produisant l'effet anti-inflammatoire le plus bas tandis que le T10 possédait l'effet le plus élevé et résultant, respectivement, des taux TNF- α /IL10 les plus élevés et les plus bas. Cependant, un effet immunomodulateur inattendu a été détecté chez les dextrans produits par nos souches, de masse moléculaire élevée (10^8).

Les cinq dextrans purifiés et testés dans ce travail ont eu un effet anti-inflammatoire global plus prononcé (taux inférieur de TNF- α /IL10) que T2000, et les quatre HoPS de *L. mesenteroides* ont une influence bénéfique similaire à celle de T10. Néanmoins, les résultats globaux et la connaissance de la réponse THP-1 aux agents pathogènes (Murthy et al., 2000) indiquent que les dextrans de *Lb. sakei* MN1 et de *L. mesenteroides* ont le potentiel de contribuer dans la minimisation des mécanismes inflammatoires et microbicides de la réponse immunitaire innée contre les agents pathogènes bactériens.

Plusieurs études suggèrent que ces biopolymères jouent un rôle important dans la protection contre les conditions environnementales défavorables comme la construction barrière physique et la colonisation de divers écosystèmes, en adhérant à des surfaces telles que la muqueuse intestinale et de la formation de biofilm. Cette dernière propriété a formé une partie de notre

étude, leur résultats obtenus ont montré que *L. mesenteroides* CM9, CM30 sont capables de former des biofilms en présence du dextrane produit à partir du saccharose, tandis qu'en présence de glucose, seulement la souche CM9 qui avait la capacité de les produire mais à un taux faible. L'expérience aussi a exposé une capacité de *Lb. sakei* MN1 à former les biofilms en présence de glucose et de saccharose avec presque le même taux. Ces résultats sont en accord avec ceux de Jahn et Nielsen (1998) qui ont montré que les polysaccharides sécrétés sont les composants les mieux étudiés de cette matrice et sont supposés être les plus abondants et les plus importants sur le plan structurel, bien que, dans certains cas, les protéines et autres matériaux prédominent. Les EPS bactériens également semblent être impliqués dans la formation de biofilms, favorisant l'adhérence aux surfaces biotiques et abiotiques ou provoquant l'agrégation des cellules (Nwodo et al., 2012). C'est le cas également de (1-3)- β -D-glucanes avec des ramifications dans la position O-2 produit par les BL isolées du cidre pour lesquels leur présence a montré qu'ils augmentaient la capacité d'adhérence des bactéries productrices (Fernández de Palencia et al., 2009 ; Garai-Ibabe et al., 2010).

Ce qui n'est pas compatible avec nos résultats précédents (Nácher-Vázquez et al., 2017), qui ont utilisé la même souche pour l'étude des biofilms et la capacité d'agrégation en montrant que MN1 était capable de former des biofilms seulement en présence de glucose seulement et l'addition du saccharose et la formation de dextrane dans le milieu provoque une désagrégation des cellules. En plus, la souche *L. mesenteroides* RTF10 mise en test aussi n'a présenté aucune capacité à former des biofilms. Cette incompatibilité peut être expliquée par la différence des deux méthodes employées pour réaliser l'étude, la première a été utilisée en conditions statiques durant 48 h d'incubation (Toledo-Arana et al., 2001), tandis que, dans la deuxième, les souches ont été incubées durant 24 h sous des conditions d'agitation (Vergara-Irigaray et al., 2009). Ce qui explique que les souches de *Leuconostoc* étaient incapables de former des biofilms sous une agitation continue. Cette conclusion est en accord avec Starkey et al. (2004), qui a montré que la matrice des biofilms est complexe et leur formation varie en fonction des microorganismes qui leur forment et de leurs conditions de croissance. Cependant, il a également été démontré que d'autres HoPS et HePS peuvent avoir un effet inverse, comme dans le cas de *Lb. johnsonii* FI9785, une bactérie pour lesquels la réduction de la production de leur HePS entraîne une augmentation de leur capacité à s'accumuler, à former des biofilms et à s'adhérer aux cellules épithéliales (Dertli et al., 2013).

Aussi, pour *Lb. rhamnosus* GG, une bactérie probiotique qui produit un EPS riche en galactose, a été trouvée, en obtenant des mutants non productifs, que la présence du biopolymère sur sa surface diminue sa capacité d'adhérence (Lebeer et al., 2009). Peut-être dans ces cas, la présence

des EPS entrave l'accès à d'autres molécules de surface, par exemple des adhésines, ou a un effet sur l'hydrophobie de la surface bactérienne qui affecte la capacité d'agrégation (Pérez et al., 1998 ; Del Re et al., 2000). Selon Côté et Leathers (2009) aussi, les biofilms peuvent contenir également des polysaccharides insolubles, Bien que leur quantité n'ait pas été quantifiée, il est possible que les biofilms *Leuconostoc* produisent des polysaccharides différents de ceux produits par des cultures planctoniques comme le dextrane, l'alterne et le levane. Ce qui a confirmé l'hypothèse de Sutherlet (2001) qui a suggéré que certaines bactéries peuvent produire différents types de polysaccharides en modifiant leurs rapports dans les biofilms.

Parmi les résultats obtenus aussi, la souche non productrice des EPS *L. mesenteroides* CM70, qui était dépourvue de cette propriété, elle n'a formé des biofilms ni en présence du glucose ni en saccharose, malgré que Wozniak et al. (2003) ont constaté que, bien que l'alginate affecte la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*, les souches non mucoïdes forment des biofilms avec peu ou pas d'alginate. De même, d'autres travaux ont constaté que les mutants d'exopolysaccharides de la souche *L. citreum* NRRL B-1355 se développaient bien comme des biofilms (Leathers et Côté, 2008). Leathers et Bischoff (2011) ont examiné la formation de biofilm par les souches de *L. citreum* et *L. mesenteroides* qui produisent une variété de polysaccharides extracellulaires et quatre catégories de glucanosucrases. Aucune corrélation apparente n'a été trouvée entre la formation de biofilm, la catégorie d'espèces, la nature des polysaccharides ou de glucanosucrase car ils avaient pensé que les glucanes extracellulaires seuls ne semblent pas déterminer le succès de la croissance du biofilm.

4- Propriétés probiotiques des souches de *L. mesenteroides*

Les probiotiques devraient être sûrs et, par conséquent, ne pas être pathogènes ou toxigènes ou administrer des gènes de résistance aux antibiotiques qui peuvent être transférés. En outre, il est également souhaitable que les souches probiotiques soient résistantes aux conditions gastro-intestinales (par exemple, pH acide gastrique, acides biliaires, etc.), Adhérer aux cellules épithéliales intestinales (Kailasapathy et Chin, 2000 ; Dunne et al., 2001), produire des composés antimicrobiens et exclure les agents pathogènes en améliorant positivement les fonctions immunitaires (Gomes et Malcata, 1999 ; Todorov et al., 2012).

Les probiotiques sont connus pour avoir une longue durée d'utilisation sécurisée et peuvent être formulés dans de nombreux types de produits, y compris les aliments, les médicaments et les suppléments diététiques. En raison de leur consommation humaine, la sécurité de ces

organismes est primordiale car leur résistance aux antibiotiques peut constituer l'une des menaces possibles. Pour cela, dans cette étude, différents groupes d'antibiotiques ont été mis en test: les inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire par : (i) l'inhibition de la transpeptidase et prévention du remodelage de la couche de peptidoglycan (amoxicilline + acide clavulanique (inhibiteur de la bêta-lactamase), ampicilline, cefazoline, cefotaxime, cefoxitine, oxacilline et pénicilline) et (ii) l'inhibition de la synthèse des peptides glycaniques (vancomycine), les inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques par l'inhibition de la topoisomérase IV et l'ADN-gyrase (ofloxacine et pefloxacine) et dernièrement les inhibiteurs de la synthèse des protéines par union à la sous-unité 30S (tetracycline) (Neu et Gootz, 1996).

Le profil de résistance aux antibiotiques de nos souches de *L. mesenteroides* présente d'une manière générale une résistance à plusieurs antibiotiques. Nos souches sont résistantes à cinq antibiotiques testés, en plus, de leur résistance à amoxicilline + acide clavulanique qui a été détectée seulement chez la souche CM9. La résistance de la vancomycine semble être un caractère courant chez les souches de *Leuconostoc* (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004), cette résistance a été utilisée dans ce présent travail pour la sélection de ce genre dès l'isolement, ce qui a facilité leur purification. La résistance aux antibiotiques chez les probiotiques ne constitue pas généralement un problème de sécurité lorsque les mutations ou les mécanismes de résistance intrinsèque sont responsables du phénotype de résistance. En fait, certaines souches probiotiques avec résistance aux antibiotiques intrinsèques pourraient être utiles pour restaurer le microbiote intestinal, après un traitement avec des antibiotiques (Gueimonde et al., 2013). La gravité de cette question est encore aggravée par la possibilité que les bactéries transfèrent les déterminants de la résistance horizontalement vers les agents pathogènes et le microbiote intestinal commensal. La résistance aux antibiotiques associée aux plasmides, qui se produit parfois, est une préoccupation, car elle peut nuire à l'utilisation de probiotiques en raison de la possibilité de propagation de la résistance aux microorganismes nuisibles colonisant le même habitat. En outre, la présence de gènes de résistance aux antibiotiques transférables même à un membre moins inoffensif de la communauté microbienne intestinale pose un risque pour la sécurité et doit être prise en compte (Sharma et al., 2014).

Généralement, les bactéries sont capables de développer des mécanismes de résistance aux agents antimicrobiens, y compris la production d'enzymes bactériennes pour inactiver les antibiotiques (Guardabassi et Courvalin, 2006) et cela en détruisant le médicament antibactérien, d'exprimer des systèmes d'effluents qui empêchent le médicament d'atteindre sa cible intracellulaire, de modifier le site cible du médicament ou de produire une voie métabolique alternative qui contourne l'action de la drogue (Tenover, 2006). Dans le cas des

bactéries gram-positives, y compris certaines espèces de *Leuconostoc*, elles peuvent produire de la β -lactamase qui sont sécrétées à l'extérieur de la cellule pour pouvoir dégrader l'antibiotique β -lactamine avant qu'il ne puisse agir. (Hummel et al., 2007).

Une sur-utilisation des antibiotiques dans le traitement et la prophylaxie des infections bactériennes pourrait être le principal facteur à l'égard de la résistance bactérienne à ces médicaments et expliquer les niveaux élevés affichés par les souches examinées par rapport à la plupart des antibiotiques étudiés. En outre, d'autres pratiques visant à accroître la production dans les exploitations agricoles peuvent également favoriser le développement de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries qui infectent les animaux (Lukášová et Šustáčková, 2003). Les bactéries probiotiques naturellement présentes dans les aliments ou les suppléments alimentaires, ou ajoutés délibérément constituent une source potentielle pour établir l'équilibre intestinal.

Les BL sont capables de produire une variété des substances antimicrobiennes tels que les acides organiques, diacétyle, peroxyde d'hydrogène et substances de nature protéique, toutes ayant des propriétés antibactériennes ou bactériostatiques. Ces métabolites jouent, non seulement le rôle d'une barrière naturelle contre les agents pathogènes et la détérioration des aliments en augmentant leur durée de conservation, mais aussi ils ont un effet positif sur le goût, l'odeur, la couleur et la texture des aliments (García et al., 2010 ; Zacharof et Lovitt, 2012).

L'étude des interactions bactériennes est très commune et plusieurs recherches ont été réalisées dans cet axe. Les souches de *L. mesenteroides* mises en test dans cette partie d'étude, ont été détectées comme des bactéries productrices des substances antimicrobiennes. Les trois souches testées ont montré une activité inhibitrice contre les souches indicatrices pathogènes *S. aureus* et *E. coli*. Cette activité peut être due, généralement, à un certain nombre de facteurs : (i) les acides lactiques et/ou l'acide acétique qui diminuent le pH en créant un environnement acide, ce qui défavorise la croissance des bactéries non tolérantes, (ii) la compétition pour les substrats et (iii) la production de substances à action bactéricide ou bactériostatique, y compris les bactériocines (Parente et Ricciardi, 1999).

L'étude des bactériocines de ses souches doit prendre en compte la grande quantité d'acides organiques produite au cours du métabolisme bactérien et devrait écarter l'inhibition due à ces acides organiques (Sorrells et Speck, 1970). C'est la raison pour laquelle l'utilisation du milieu tamponnée aide à stabiliser le pH et à écarter l'effet d'acidité dû à la production d'acides lactiques (Labioui et al., 2005) ce qui facilite la révélation de l'effet d'un autre agent possédant l'activité inhibitrice. Tous les diamètres mesurés (mm) des zones d'inhibition des souches

testées quelle que soit par la méthode directe ou indirecte ont diminué, car l'activité antagoniste des bactéries lactiques contre les souches pathogènes est due majoritairement à la diminution du pH.

La croissance de certaines bactéries lactiques entraîne aussi la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), qui est considéré comme un inhibiteur de la croissance bactérienne (Hertzberger et al., 2014) . Cet agent peut être dégradé par une enzyme, la catalase, présente chez certaines espèces bactériennes telles que *S. aureus*, donc l'inhibition due à ce composant a été écartée.

Afin de s'assurer que les substances inhibitrices produites sont de nature protéique, on a traité le surnageant des cultures de *L. mesenteroides* par une enzyme protéolytique, la pepsine. On a remarqué l'absence totale des zones d'inhibitions seulement chez la souche CM70. Ce qui fait suggérer que cette souche produit une biomolécule de nature protéique qui causent l'inhibition des autres bactéries indicatrices. Ces composés peuvent être des bactériocines. Il faut noter que ces substances antimicrobiennes ne sont pas forcément des bactériocines, des expériences sont indispensables pour connaître la nature exacte de ces composants. Il faut aussi garder en tête que la production de bactériocines peut être affectée par une série de facteurs comme la composition du milieu de culture, y compris le carbone, l'azote et les sources de phosphates, les agents inhibiteurs, le pH optimal, l'aération et la température de croissance (Daba et al., 1993). La production de bactériocines par le genre *Leuconostoc* a été affirmée dans plusieurs études (Osmanağaoğlu, 2007 ; Trias et al., 2008 ; Xiraphi et al., 2008). Les résultats obtenus de nos souches, isolées du lait de chamelle, sont en accord avec Ghita et al. (2015) qui ont aussi montré que les souches de *L. mesenteroides* ont eu des activités antibactériennes élevées contre *Bacillus cereus* ATCC 33018 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 par rapport aux autres souches de *Bifidobacterium*. Cependant, Shehata et al. (2016) ont montré que plusieurs BL isolées de Zabady et des échantillons de fromage ont montré une activité inhibitrice contre plusieurs agents pathogènes, y compris *S. aureus* et *E. coli*. Aucune activité antagoniste n'a pu être observée pour les souches isolées du lait de vache. Plusieurs travaux employant les souches de *L. mesenteroides*, isolées de différents écosystèmes, ont montré leurs caractéristiques probiotiques souhaitables qui leur qualifie d'être utiliser en industrie agroalimentaire (Chentouf et al., 2013 ; Zhang et al., 2013; de Paula et al., 2015, Diana et al., 2015 ; Giles-Gómez et al., 2016 ; Yadav et al., 2016 ; Emmanuel et al., 2017).

De nos jours, les producteurs d'aliments sont confrontés à plus de défis, car les consommateurs sont plus conscients de l'importance de la salubrité des aliments, et ils demandent des aliments

naturels et de meilleure qualité. Les producteurs doivent également tenir compte des exigences du gouvernement pour garantir la salubrité des aliments (Zacharof et Lovitt, 2012). Dans ce contexte, les bactériocines deviennent plus attrayantes car elles proviennent de sources naturelles et contribuent à la salubrité des aliments (Yang et al., 2014). Pour que les bactéries offrant des avantages probiotiques à la santé humaine, elles doivent rester viables dans les produits alimentaires au-dessus d'un seuil bien défini (10^6 ufc g^{-1}) jusqu'au moment de la consommation, sans altérer les attributs sensoriels. Cette viabilité, en industrie laitière, peuvent être classé dans trois domaines: (i) les facteurs de formulation (souches de bactéries probiotiques et interactions microbiennes, pH et acidité titrable, peroxyde d'hydrogène, oxygène moléculaire, promoteurs de croissance et additifs alimentaires, sel et facteurs de maturation), (ii) les facteurs de processus (température d'incubation, traitement thermique, types d'inoculation et température de stockage) et (iii) les matériaux et systèmes d'emballage (Karimi et al., 2011).

La capacité des bactéries probiotiques à survivre à la pasteurisation est également une caractéristique souhaitable dans le cas de cultures destinées à être des ingrédients des aliments soumis au traitement thermique. Une grande variété de facteurs influent sur la résistance bactérienne à la chaleur, parmi lesquels la résistance intrinsèque, les facteurs environnementaux actifs pendant la croissance des bactéries et les facteurs environnementaux actifs pendant l'échauffement des suspensions bactériennes, ont été mis en évidence (Franz et al., 1999). Remarquablement, dans notre étude, une diminution significative des cellules viables a été observée chez toutes les souches testées durant 1 min et 5 min d'incubation à 60 °C. Il faut signaler que seule la souche CM9 qui a présenté le taux le plus élevé de résistance tout au long de cette incubation, Cela souligne leur utilisation potentielle dans les produits alimentaires pasteurisés. Selon Hosseini et al. (2009), aucun des tests précédents n'a été significativement affecté par le chauffage à 60 °C des souches de *E. faecium*. En revanche, une forte diminution de taux de survie a été détecté après 5 min d'exposition à 80 °C. Néanmoins, il existe peu de recherches disponibles portant sur la thermorésistance des probiotiques lorsqu'elles sont appliquées à des produits non réfrigérés autres que le lait et les produits laitiers (Corona-Hernandez et al., 2013).

Un pourcentage élevé de la population a des troubles gastro-intestinaux en raison d'une mauvaise alimentation, d'un mode de vie malsain et du stress (Douglas et Seters, 2008). Les probiotiques sont conçus comme une stratégie pour restaurer la composition et la fonction de le microbiote intestinal, ce qui peut contribuer à diminuer les troubles gastro-intestinaux

(Guarner et al., 2008 ; Correia et al., 2012). Les genres les plus importants de probiotiques commercialisés à ce jour sont *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Geier et al., 2007), mais peu d'études sont faites sur le genre *Leuconostoc*, puisqu'on l'a généralement supposé que les souches de *Leuconostoc* ne survivent pas lors du passage à travers l'appareil digestif, cela est dû au pH faible de l'estomac et à la présence de sels biliaires dans l'intestin. Cependant, des travaux récents ont suggéré que *Leuconostoc* puissent survivre (Giles-Gómez et al., 2016). Les probiotiques peuvent fournir un soulagement de l'intolérance au lactose et prévenir des symptômes indésirables (Kaur et al., 2002). La plupart des bactéries probiotiques commercialisées ont été isolées à partir de produits fermentés laitiers et de matières fécales humaines (Conway et al., 1987 ; Fooks et al., 1999). Cependant, la preuve de l'efficacité des probiotiques existants chez les humains est moins forte que prévu (Neef et Sanz, 2013), ce qui a favorisé la sélection des souches avec des fonctions améliorées à partir de sources non conventionnelles (Argyri et al., 2013).

L'étude, *in vitro*, réalisée dans ce travail, a montré que les souches de *L. mesenteroides* peuvent survivre contre les conditions de stress trouvées dans le tractus gastro-intestinal, mais avec un pourcentage inférieur à 50%. Dans ce sens, le faible pH de l'estomac et l'action antimicrobienne de la pepsine sont connus comme une véritable barrière contre l'entrée et la survie des bactéries dans le tractus intestinal. Bien que nos souches aient présenté une viabilité moyenne à des pH faibles (3 et 2) pendant 3 heures, cette durée reflète la moyenne du temps passé par les aliments dans l'estomac (Argyri et al., 2013).

Les mécanismes de régulation d'acide des BL n'ont pas réussi à maintenir leur pH intracellulaire et l'acidification interne a réduit l'activité des enzymes en endommageant certaines protéines et l'ADN, ce qui conduit à la mort, ce qui explique la diminution des taux de survie (van de Guchte et al., 2002). D'autres études ont également indiqué que les BL, y compris les leuconostocs, ont pu croître et survivre à des niveaux de pH bas (Divya et al., 2012 ; Diana et al., 2015 ; Shehata et al., 2016), mais il est important de souligner que les essais *in vitro* impliquant le pH ne peuvent prédire tous les comportements du corps humain, en raison de l'existence d'autres facteurs qui affectent la survie des microorganismes dans le tractus gastro-intestinal supérieur tels que la présence de différentes enzymes et les mouvements péristaltiques (Vinderola et Reinheimer, 2003 ; Koseki et al., 2011). Pour cela, on a combiné, dans un autre essai, la présence de pepsine, à une concentration de 3 mg mL⁻¹, et l'acidité du milieu ramené à pH 3 et pH 2 nos souches, mises en test, ont pu résister au pH 3 mieux qu'au pH 2, en notant que la souche CM9 a présenté un taux de survie plus élevé face à l'acidité et à la pepsine. Plusieurs

travaux ont montré la résistance des BL aux enzymes digestives (Diana et al., 2015 ; Ng et al., 2015 ; Ashraf et Smith, 2016).

À ce stade, les bactéries utilisées comme probiotique doivent résister aux procédés de digestion et aux conditions de stress de l'estomac et de l'intestin, qui contient de la bile (Chou et Weimer, 1999), qui est une solution aqueuse jaune dont la fonction est comme un détergent biologique qui émulsionne et solubilise les lipides, jouant ainsi un rôle essentiel dans la digestion des graisses. Cette propriété détergente de bile confère également une activité antimicrobienne puissante en jouant un rôle important dans les mécanismes de défense de l'intestin, principalement par la dissolution des membranes bactériennes. Ses effets inhibiteurs dépendent des concentrations utilisées (Charteris et al., 1998). D'après notre test *in vitro*, les trois souches ont pu résister à des concentrations entre 0,3%, 1% et 2%, qui ont été recommandées par d'autres auteurs (Hyronimus et al., 2000) pour la sélection de bactéries probiotiques à usage humain, avec des taux de survies variables entre une souche et une autre. Les BL isolées des olives fermentées et des produits laitiers fermentés traditionnels africains pourraient survivre aux conditions de stress trouvées dans le tractus gastro-intestinal (Vizoso Pinto et al., 2006 ; Argyri et al., 2013). Les valeurs rapportées par Paula et al. (2015) étaient similaires aux valeurs obtenues dans cette étude. Ce comportement positif peut augmenter la possibilité de ces souches de coloniser dans l'état de l'intestin et de survivre dans des conditions de stress (Cebeci et Gurakan, 2003).

Le passage stomaco-duodéal représente un environnement complet pour la survie des BL dans l'estomac et le duodénum humain, La résistance des souches bactériennes dans le jus gastrique humain est une indication plus précise de la capacité des souches à survivre au passage à travers l'estomac. Pour cette raison, un test de survie *in vitro* dans le jus gastrique simulé a été effectué dans des conditions de laboratoire. Ce test est conçu pour représenter un système de test simplifié et standardisé donnant des valeurs prédictives pour la survie présumée des souches de *Leuconostocs* dans l'estomac humain et le duodénum dans des conditions « normales ».

Le principe implique d'abord une simulation de l'estomac contenant des BL ingérées après un repas. Après 1 h, des sécrétions de duodénum biliaires et artificielles sont ajoutées pour simuler le passage ultérieur. L'analyse des résultats dans cette étude a révélé une meilleure survie pour CM9 que pour les autres souches lorsqu'elles sont exposées à des solutions à faible pH et aux conditions défavorables imposées par la composition de ce milieu synthétique. Le nombre de cellules viables a connu une fluctuation, mais il tend à se réduire après 3 h d'incubation. La tolérance au faible pH ne suffit pas pour prédire la survie d'une souche lors de son passage à

travers l'appareil digestif, dans les conditions de l'estomac. L'étude de la tolérance à la bile et le suc pancréatique est aussi importante pendant une période donnée. Le temps de transit peut être variable de 1 h, 3 h à 4 h selon l'individu, l'alimentation et autres conditions, cela peut influencer la viabilité des bactéries probiotiques (Vizoso Pinto et al., 2006).

L'étude conduite par Vizoso Pinto et al. (2006) sur trente-cinq souches de *Lactobacillus sp.*, a révélé la tolérance de sept souches au stimulus stomaco-duodéal avec une survie qui varie entre 11% et 93%. Mathara et al. (2008) ont montré que plusieurs espèces de *Lactobacillus* isolées d'un lait fermenté traditionnel ont présenté une résistance élevée et assez stable au stimulus gastro-duodéal pour toutes les souches. Les Mêmes résultats ont été confirmés par Yadav et al. (2016). Contrairement à Xanthopoulos et al. (2000), qui a rapporté une meilleure survie pour *Lb. casei* que pour *Lb. acidophilus*. Les résultats obtenus suggèrent que nos isolats laitiers pourraient transiter l'estomac humain et peuvent être capables d'atteindre l'environnement intestinal et de fonctionner efficacement là-bas.

Pour qu'une souche soit probiotique, elle doit aussi survivre à l'action des métabolites toxiques, principalement des phénols, produits lors du processus de digestion (Kumar et al., 2012). Certains acides aminés aromatiques dérivés de protéines alimentaires ou endogènes peuvent être désaminés dans l'intestin par des bactéries conduisant à la formation de phénols qui ont des propriétés bactériostatiques (Suskovic et al., 1997). Par conséquent, les probiotiques doivent pouvoir survivre à des concentrations de phénol comprises entre 0,3% et 0,6% p/v (Acharya et Shah, 2002).

L'effet de 0,4% de phénol sur la croissance des souches de *L. mesenteroides* après 24 h d'incubation dans le milieu MRS à 30 °C a été examiné en montrant différents degrés de sensibilité. La tolérance la plus élevée (20,36%) a été démontrée pour la souche CM9, tandis que les autres deux souches qui ont présenté une faible tolérance. La même variabilité a été détectée chez Vizoso Pinto et al. (2006), qui ont observé des degrés variables de sensibilité pour quatre souches de *Lb. johnsonii* qui étaient plus sensibles à la même concentration de phénol dont aucun taux de survie n'a été détecté. Les souches de *Lb. plantarum*, qui sont physiologiquement étroitement liées à l'espèce précédente, sont généralement modérément tolérantes. Par contre, Yadav et al., 2016 ont montré une bonne survie et très faible sensibilité des souches de *Lb. platarum* durant 24 h d'incubation face à 0,4% de phénol. De même, Ghita et al. (2015) ont constaté que les souches de *L. mesenteroides* ainsi que celles de *B. longum*, *B. breve* et *B. bifidum* a considérablement diminué en augmentant la concentration de phénol de 0,3% à 0,5% durant 48 h d'incubation. Les souches de *L. mesenteroides* ont présenté la plus

forte résistance au phénol à 0,4%. Par conséquent, les bactéries tolérantes aux phénols peuvent avoir plus de chances de survie que celles qui ne sont pas Xanthopoulos et al. (2000).

La colonisation de l'intestin peut être une autre propriété d'intérêt probiotique. La première étape de la formation du biofilm est l'attachement bactérien aux surfaces solides, qui dépend des propriétés physico-chimiques de la surface bactérienne, en assurant une bonne adhérence à différents types de surfaces solides et solvants. Ce qui nous a poussé à étudier l'hydrophobicité des souches de *Leuconostoc*, isolées des laits. Cette hydrophobicité peut dépendre de différents composés couramment utilisés (n-hexadécane, xylène, chloroforme et toluène) et sur les souches évaluées qui peuvent conduire à des résultats différents. On sait que la capacité à adhérer au mucus est une exigence d'un microorganisme probiotique. La couche de mucus est un matériel visqueux qui abrite le tractus intestinal et se compose principalement de protéines glycosylées (mucines) et de glycolipides, ainsi que d'anticorps, d'ions, de produits alimentaires et d'eau (Ofek et al., 2003).

Dans notre travail, on a utilisé le xylène pour étudier l'hydrophobicité superficielle des cellules bactériennes, et d'après les résultats, la souche CM9 est la plus adhérente (45,65%). Cependant, aucune différence significative n'a été détectée parmi les pourcentages d'hydrophobicité de souches CM30 et CM70, qui était d'environ 30%. En outre, ces souches ont une adhérence significativement plus élevée que la souche probiotique de *Lb. acidophilus* LA-5, utilisée dans les travaux de Ng et al. (2015) comme référence, qui a adhéree à l'hexadécane avec un pourcentage de 20%. Néanmoins, les pourcentages d'adhérence de ces souches testées semblent être relativement meilleurs que les souches de *Lactobacillus* précédemment signalés Samot et al. (2011).

Les souches de *L. lactis* avec plus de 40% d'affinité avec les solvants polaires sont particulièrement hydrophobes (Giaouris et al., 2009). En comparant ce dernier avec notre étude, seule la souche CM9 présentait une surface hydrophobe. En plus, les mêmes auteurs ont cité plusieurs paramètres affectant le taux d'hydrophobicité chez les souches de *L. lactis*: (i) le caractère élevé des donneurs d'électrons qui est lié à la présence du plasmide citrate permease P (Lý et al., 2007) ; (ii) la variation structurelle, chimique et moléculaire de la surface de paroi cellulaire qui se compose principalement d'une épaisse couche d'acides peptidoglycane, teichoïque et lipoteichoïque, de protéines exposées à la surface et de polysaccharides (Delcour et al., 1999) ; (iii) la concentration d'azote ou de carbone de la paroi cellulaire externe (Boonaert et Rouxhet, 2000, Mozes et al., 1988) et (iv) la présence de la serine proteinase PrtP qui déclenche une dégradation protéolytique de la caséine du lait et considérée parmi les adhésines

connues qui confèrent les propriétés adhésives aux bactéries (Habimana et al., 2007). Frantzen et al. (2017) a mentionné que plusieurs souches de *L. mesenteroides*, isolées des produits laitiers, expriment cette protéine.

La capacité à adhérer aux entérocytes est une caractéristique potentiellement importante pour sélectionner les souches probiotiques, et les résultats précédents ont indiqué que la capacité d'adhérence de *Lb. sakei* MN1 mais pas de *L. mesenteroides* RTF10 aux cellules Caco-2 ont été affectées par la présence de dextrane (Nácher-Vázquez et al., 2017). Par conséquent, l'influence de la synthèse du dextrane sur la capacité de liaison des souches de *L. mesenteroides* isolées des laits (CM9, CM30 et SM34) (Fig. 61), sur cellules Caco-2 ont été testées par rapport à celles isolées des produits carnés (RTF10 et MN1), en employant aussi comme référence la souche probiotique *Lb. acidophilus* LA-5. Les résultats ont révélé que MN1, CM9 et LA-5 ont pu adhérer aux entérocytes avec un pourcentage proche de 5%, en présence de DMEM contenant du glucose, ces taux étant similaires à ceux signalés par Fernández de Palencia et al. (2009) ; Garai-Ibabe et al. (2010). En outre, l'adhérence des souches MN1 et CM9 aux cellules Caco-2 a diminué lorsque le saccharose était présent pendant le dosage en milieu CDMS. En revanche, l'adhésion des autres souches de *L. mesenteroides* n'ont pas été significativement affectées par la présence de saccharose dans le milieu. Ces résultats corrélerent avec ceux obtenus lors de l'étude de l'hydrophobicité dont la bactérie présentant le taux le plus élevé (CM9), adhère mieux à la monocouche des cellules épithéliales Caco-2.

Ces derniers présentent une relation étroite avec ceux indiqués précédemment lors de l'incubation des souches étudiées dans un milieu solide saccharosé ou leurs colonies ont montré deux phénotypes différents, indépendamment de genre et d'espèce et de l'écosystème d'isolement. Par conséquent, ce comportement ne semble pas être lié à la fermentation homolactique du glucose par *Lb. sakei* versus la fermentation hétérolactique de *L. mesenteroides*, ni à la capacité de produire du dextrane. Les souches de *L. mesenteroides* telles que NRRLB_1149, ne métabolise pas le saccharose que par la dextrane-saccharase, mais également par des activités de saccharose phosphorylase (Lee et al., 2006). Plutôt, il semble être connecté aux propriétés ou au devenir du dextrane. La taille du polymère et la structure chimique spécifique et la composition de la molécule des EPS pourraient affecter l'adhérence. Ainsi, nous avons montré que le HoPS (1-3) - β -D-glucan substitué par le O-2 (synthétisé par *P. parvulus*) contribue à l'attachement aux cellules épithéliales du côlon (comme indiqué ci-dessus). En outre, les EPS pourrait être un médiateur positif de l'adhésion bactérienne, comme cela a été rapporté dans plusieurs études réalisées dans *Bifidobacteria* et *Lactobacillus* (Alp et

al., 2010 ; Sims et al., 2011). Cependant, ce n'est pas une caractéristique générale pour EPS des BL. Par exemple, il a été démontré que, dans les souches de *Lb. rhamnosus*, l'adhésion aux entérocytes augmentait, lorsque la synthèse de la EPS de masse moléculaire élevée, riche en galactose ou en rhamnose, a été supprimée par mutation dans des gènes codants (Lebeer et al., 2009). Horn et al. (2013) ont également rapporté qu'une diminution de la production d'EPS dans *Lb. johnsonii* peut entraîner une forte augmentation de l'adhésion de ces bactéries. En accord, nos résultats ont montré que la production de dextrane en l'absence de la synthèse des EPS a diminué l'adhérence ou n'a pas été affectée. Ainsi, un effet bénéfique de ces polymères dans l'adhésion n'a pas été détecté. Cette conclusion ne concorde pas avec celle de la formation de biofilms (Fig. 56), car cette dernière est liée étroitement avec le temps d'incubation en présence de saccharose et les conditions de croissance, dont la maturation des biofilms renforce la matrice (Abdallah et al., 2014 ; Rossi et al., 2016). En outre, les interactions avec les surfaces biotiques et abiotiques peuvent être différentes.

Pour accroître la connaissance des effets probiotiques et leurs mécanismes potentiels, nous rapportons l'utilisation du modèle du poisson zèbre pour étudier la capacité de la colonisation du tractus intestinal *in vivo*. Les souches de *L. mesenteroides* CM9, CM30 et CM70, isolées de lait de chamelle algérien, ont été mises en contact avec les larves des poissons zèbres. Les taux de colonisation ont été évalués après 6 h et 24 h de contact. Les résultats ont montré que seulement la souche CM9 était la bactérie la plus adhésive et capable de coloniser le tube digestif des larves (Fig. 64). Cette colonisation a diminué après 24 h. Ce qui nous intéresse beaucoup plus sont les résultats de 6 h car elles reflètent le temps de séjour des aliments probiotiques dans le tube digestif humain puisque sont des aliments de consommation quotidienne.

Russo et al. (2015) ont développé un système d'étude basé sur mCherry pour évaluer le potentiel probiotique des souches *Lactobacillus* dans un modèle de larves de poissons zèbres gnotobiotiques. De nos jours, les méthodes d'étiquetage fluorescent sont de plus en plus utilisées pour obtenir des preuves en temps réel et *in vivo* d'une large gamme de phénomènes biologiques (Chudakov et al., 2005), y compris, le devenir des souches probiotiques potentielles dans l'intestin des larves de poisson zèbre gnotobiotiques transparentes. De plus, la combinaison du mCherry dans les souches des BL avec, par exemple, des bactéries exprimant la GFP (la fluorescence verte) permettra l'étude des tests de compétition *in vivo*. Ce dernier a fait l'objet d'une étude réalisée par notre laboratoire, où Nacher-Vázquez et al., 2017 ont marqué par fluorescence la souche *Lb. sakei* MN1 avec le plasmide pRCR12, cette transformation n'a pas

altéré les propriétés technologiques de la souche, principalement, ses capacités d'autoaggrégation *in vitro*. En plus, ils ont démontré que cette bactérie peut coloniser le tractus digestif des larves de poissons zébrés gnotobiotiques et rivaliser avec la bactérie pathogène *V. anguillarum* NB10[pOT11], marqué avec GFP. La colonisation de l'intestin par MN1[pRCR12] était plus élevée en présence de glucose qu'en présence de saccharose. Ceci a corrélé avec les résultats obtenus *in vitro* qui ont montré une capacité d'adhérer les cellules Caco-2. Une approche similaire a été proposée pour la première fois en tant que système de dépistage *in vivo* pour détecter les souches probiotiques avec des propriétés anti-inflammatoires (Rieu et al., 2014, Runft et al., 2014). Cependant, bien que les souches appartenant à plusieurs espèces des BL puissent être considérées comme de bons candidats probiotiques, la plupart des études sur le poisson zèbre ont utilisé le probiotique *Lb. rhamnosus* comme microorganisme de référence (Avella et al., 2012, Maradonna et al., 2013).

Enfin, on voudrait souligner que dans ce travail, l'analyse des différentes propriétés technologiques de la bactérie ainsi que l'étude fonctionnelle et rhéologique de leurs dextrans réalisés *in vitro* et *in vivo* renforce la probabilité d'intégrer nos souches de *L. mesenteroides* d'intérêt biotechnologique dans le domaine agro-alimentaire comme des candidats probiotiques.

Conclusion

Les bactéries du genre *Leuconostoc* ont été visées dans ce présent travail, l'isolement a été réalisé en Algérie à partir des plusieurs échantillons de six écosystèmes : lait de chamelle, lait de chèvre, lait de brebis, fromage bleu, ensilage et miel. Leur caractère résistant à la vancomycine nous a facilité leur isolement ainsi que leur sélection.

D'après les résultats obtenus au cours de cette thèse de doctorat, on a pu tirer les conclusions suivantes :

1. L'identification phénotypique (tests biochimiques et physiologiques) et génotypique (ADNr 16S et PCR spécifique) ont indiqué que les vingt-huit souches isolées appartiennent à l'espèce *L. mesenteroides* dont 17 souches ont été classées comme *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.
 2. La plupart des souches de *L. mesenteroides* ont présenté une activité protéolytique et lipolytique importantes ainsi que d'autres propriétés technologiques importantes comme l'utilisation de citrate ou il a été démontré que les souches possèdent le gène *citP* codant pour la citrate perméase P.
 3. L'électrophorèse des protéines totales des bactéries testées appartenant à différents écosystèmes a révélé que profil presque identique avec un taux de similitude, globalement, varie entre 85% et 100%.
1. Les niveaux de production des EPS des vingt-huit souches de *Leuconostoc*, isolées de différents écosystèmes (obtenus à la même DO, sans contrôle du pH et avec une concentration initiale de saccharose de 57 mM) ont basculé entre $0,55 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1}$ et $3,52 \pm 0,18 \text{ g L}^{-1}$.
 2. Les cinq souches typiques, les souches algériennes isolées et sélectionnées dans ce travail (*L. mesenteroides* CM9, CM30, SM34) et des souches espagnoles isolées à partir de produits carnés (*L. mesenteroides* RTF10 et *Lb. sakei* MN1) mises en test ont été capables, en présence de saccharose comme seule source de carbone, de produire des homopolysaccharides de type dextrane dénommés EPS CM9, EPS CM30, EPS SM34, EPS RTF10 et EPS MN1, respectivement. Son analyse physico-chimique a montré que tous sont des polymères primordialement linéaires avec des liaisons α -(1,6) dans leur chaîne principale (entre 85,3% et 89,4%) avec des ramifications α -(1,3) (entre 8,5 % et 10,3%).
 3. Les conditions optimales de production des dextranes dans le milieu défini CDM, ainsi que leur récupération des surnageants de culture, par précipitation avec de l'éthanol, et leurs purifications ultérieures par dialyse et fractionnement chromatographique ont été

stabilisés. Avec cette procédure, il a été possible de récupérer jusqu'à 62% des dextrans dans la phase finale avec un degré de pureté de 99%, utilisable pour évaluer leur activité biologique postérieure.

4. La détermination de la masse moléculaire des dextrans, obtenue par l'utilisation de SEC-MALLS, a révélé que les EPS ont une masse élevée (entre 1×10^8 et 5×10^8 Da par rapport aux dextrans commerciaux utilisés comme référence.
5. Les études rhéologiques ont montré que tous les dextrans étudiés ont le même comportement pseudoplastique qui varie avec la concentration des polymères utilisée, ainsi que, les résultats ont suggéré que la viscosité augmente avec la concentration de dextrane. Leurs C^* ont varié entre 0,5% et 1% en montrant une structure sous forme d'une bobine aléatoire avec des chaînes flexibles.
6. Les souches productrices de dextrane *L. mesenteroides* CM9, CM30, SM34 et RTF10 et *Lb. sakei* MN1 ainsi que la souche non productrice *L. mesenteroides* CM70 ont consommé du saccharose dans son ensemble, mais elles ont présenté, en présence de 23 mM de saccharose, des différences métaboliques dans le profil de production/consommation du fructose, du glucose, de l'acide lactique et du mannitol, ce qui montre les différentes voies métaboliques utilisées par les deux genres mis en test.
7. Aucun effet toxique des dextrans sur l'activité métabolique des macrophages PMA-THP-1 et, par conséquent sur leur viabilité, n'a été détecté. Ce qui nous a permis de tester leur bioactivité qui a indiqué que nos souches peuvent contribuer à minimiser les mécanismes inflammatoires et microbicides de la réponse immunitaire contre les agents pathogènes bactériens et cela en montrant une activité immunomodulatrice anti-inflammatoire *in vitro* dans la lignée cellulaire THP-1.
8. La détection du gène partiel *dsr* et leur séquençage a révélé que toutes les souches y compris les non productrices, possèdent le gène codant pour la dextrane-saccharase.
9. L'évaluation des propriétés probiotiques ont montré que la souche *L. mesenteroides* CM9 est la plus qualifiée à être utilisée comme bactérie probiotique vu son profil de résistance aux conditions de stress du tractus gastro-intestinal ainsi que leur éventuel pouvoir antagoniste. La capacité à adhérer aux entérocytes type Caco-2, une caractéristique potentiellement importante pour la sélection des souches probiotiques, a indiqué que la capacité d'adhérence aux cellules a varié d'une espèce à une autre et que la production de dextrane n'a pas d'effet bénéfique sur l'interaction initiale avec ces entérocytes, mais ces bactéries, notamment *L. mesenteroides* CM9, peuvent contribuer

à la colonisation supplémentaire de la niche écologique. Ce qu'a été confirmé par les essais de la colonisation *in vivo* du poisson zèbre qui a révélé que seulement la souche CM9 était capable de coloniser l'intestin des larves gnotobiotiques.

Les résultats de ce présent travail élargissent notre connaissance de la production des EPS par les BL et de leur rôle biologique. Par conséquent, ces souches, en particulier la souche *L. mesenteroides* CM9, sont de bons candidats pour élucider leurs avantages potentiels pour la santé comme (i) des cultures protectrices, (ii) des fermenteurs starters dans les produits alimentaires, (iii) des candidats probiotiques d'intérêt technologique et (iv) comme des bactéries productrices des EPS en tant qu'agents antiviraux, immunomodulateurs et prébiotiques afin d'être utilisés à l'avenir pour l'élaboration d'aliments fonctionnels et d'aliments pour animaux.

Comme perspectives :

1. La localisation génomique du gène *dsr* par Southern Blot ainsi que la détermination de sa séquence nucléotidique.
2. L'analyse de l'expression du gène *dsr* et la purification de l'enzyme dextransaccharase.
3. L'étude approfondie du phénotype des certains dextrans caractérisés par un aspect semi-liquide en analysant les différents facteurs responsables de ce phénomène.
4. L'étude approfondie de la bioactivité des dextrans produits (activité antivirale, anticancéreuse, etc...) et l'étude de l'expression génique par la PCR quantitative.
5. Le marquage fluorescent des souches de *L. mesenteroides* par transfert du plasmide pRCR12 aux souches de *L. mesenteroides*.
6. La détection et l'étude de l'expression de la protéine fluorescente mCherry et sa stabilité.

Références bibliographiques

- Abdallah, M., Chataigne, G., Ferreira-Therand, P., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., & Chihib, N.E.** (2014). Effect of growth temperature, surface type and incubation time on the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6), 2597-2607.
- Acharya, M. R., & Shah, R. K.** (2002). Selection of human isolates of *Bifidobacteria* for their use as probiotics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 102(1), 81-98.
- Agarwal, M., Garg, F. C., & Negi, Y. K.** (2014). Antibiotic resistance and plasmid profile of *Leuconostoc spp.* isolated from carrot. *Journal of Bacteriology Research*, 6(1), 7-12.
- Agarwal, S., Burgard, M., Greiner, A., & Wendorff, J.** (2016). *Electrospinning: A Practical Guide to Nanofibers*: De Gruyter.
- Ahmed, R. Z., Siddiqui, K., Arman, M., & Ahmed, N.** (2012). Characterization of high molecular weight dextran produced by *Weissella cibaria* CMGDEX3. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 441-446.
- Akin, D. E., & Rigsby, L. L.** (1990). Preservation of ruminal bacterium capsules by using lysine in the electron microscopy fixative. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), 2933-2935.
- Alegria, Á., Delgado, S., Flórez, A. B., & Mayo, B.** (2013). Identification, typing, and functional characterization of *Leuconostoc spp.* strains from traditional, starter-free cheeses. *Dairy Science & Technology*, 93(6), 657-673.
- Alp, G., Aslim, B., Suludere, Z., & Akca, G.** (2010). The role of hemagglutination and effect of exopolysaccharide production on *Bifidobacteria* adhesion to Caco-2 cells *in vitro*. *Microbiology and Immunology*, 54(11), 658-665.
- Aman, A., Siddiqui, N. N., & Qader, S. A. U.** (2012). Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 910-915.
- Aplevicz, K. S., Mazo, J. Z., Ilha, E. C., Dinon, A. Z., & Sant'Anna, E. S.** (2014). Isolation and characterization of lactic acid bacteria and yeasts from the Brazilian grape sourdough. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 321-327.
- Arena, M. P., Russo, P., Capozzi, V., López, P., Fiocco, D., & Spano, G.** (2014). Probiotic abilities of riboflavin-overproducing *Lactobacillus* strains: a novel promising application of probiotics. *Applied Microbiology Biotechnology*, 98(17), 7569-7581.
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.-A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C.** (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiology*, 33(2), 282-291.
- Ashraf, R., & Smith, S.** (2016). Commercial lactic acid bacteria and probiotic strains-tolerance to bile, pepsin and antibiotics. *International Food Research Journal*, 23(2), 777-789

- Avella, M. A., Place, A., Du, S.-J., Williams, E., Silvi, S., Zohar, Y., & Carnevali, O.** (2012). *Lactobacillus rhamnosus* accelerates zebrafish backbone calcification and gonadal differentiation through effects on the GnRH and IGF systems. *PLoS ONE*, 7(9), e45572.
- Badel, S., Bernardi, T., & Michaud, P.** (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnological Advances*, 29(1), 54-66.
- Badis, A., Guandarni, D., Moussa Boudjema, B., Henni, D. E., & Kihal, M.** (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21(5), 579-588.
- Bajpai, V. K., Rather, I. A., Majumder, R., Shukla, S., Aeron, A., Kim, K., Kang, S. C., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K., Lim, J., Park, Y. H.** (2015). Exopolysaccharide and lactic acid bacteria : Perception, functionality and prospects. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 11(1), 1-23.
- Balcázar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Gironés, O., & Muzquiz, J. L.** (2007). Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 30(2), 111-118.
- Bandell, M., Lhotte, M. E., Marty-Teyssand, C., Veyrat, A., Prévost, H., Dartois, V., Diviès, C., Konings, W. N. & Lolkema, J. S.** (1998). Mechanism of the Citrate Transporters in Carbohydrate and Citrate Comandabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), 1594-1600.
- Barrangou, R., Lahtinen, S., Ibrahim, F., & Ouwehand, A.** (2011). Genus *Lactobacillus* lactic acid bacteria, CRC Press. 77-91
- Barrando Penna, A. L., Toedoro de Paula, A., Neves Casarotti, S., Faria Silva, L., Ribeiro Diamantino, V., & Dimitrov Todorov, S.** (2015). Overview of the functional lactic acid bacteria in fermented milk products. In: Ravisharnkar Rai V. & Bai J. A. (Eds.), Beneficial microbes in fermented and functional foods, *CRC Press*. 7, 113-137.
- Barrière, C., Veiga-da-Cunha, M., Pons, N., Guédon, E., van Hijum, S. A. F. T., Kok, J., Kuipers, O. P., Ehrlich, D. S. & Renault, P.** (2005). Fructose Utilization in *Lactococcus lactis* as a Model for Low-GC Gram-Positive Bacteria: Its Regulator, Signal, and DNA-Binding Site. *Journal of Bacteriology*, 187(11), 3752-3761.
- Bartowsky, E. J., & Henschke, P. A.** (2004). The 'buttery' attribute of wine--diacandyl--desirability, spoilage and beyond. *International Journal Food of Microbiology*, 96(3), 235-252.
- Baruah, R., Deeplina, D., & Goyal, A.** (2016). Handeropolysaccharides from lactic acid bacteria: Current trends and applications. *Journal of Probiotics and Health*, 4(2).
- Bellengier, P., Hemme, D., & Foucaud, C.** (1994). Citrate mandabolism in 16 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and subsp. *dextranicum* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 77(1), 54-60.

- Benmechernene, Z., Chentouf, H. F., Yahia, B., Fatima, G., Quintela-Baluja, M., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J.** (2013). Technological aptitude and applications of *Leuconostoc mesenteroides* bioactive strains isolated from algerian raw camel milk. *BioMed Research International*, 2013. 418132. 1-14.
- Bhatt, S. M., Mohan, A., & Srivastava, S. K.** (2013). Challenges in enzymatic route of mannitol production. *International Scholarly Research Notices Biotechnology*, 2013, 914187. 1-13.
- Bhavani, A. L., & Nisha, J.** (2010). Dextran - the polysaccharide with versatile uses. *International Journal of Pharmacology & Biotechnological Sciences*, 1(4), 569-573.
- Björkroth, J., & Holzappel, W.** (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Springer New York. 4, 267-319.
- Bohdanecký, M., & Kovář, J.** (1982). *Viscosity of Polymer Solutions: Elsevier Scientific Publishing Company*.
- Boonaert, C. J., & Rouxhand, P. G.** (2000). Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2548-2554.
- Bounaix, M. S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Rемаud-Simeon, M., Gabriel, B. & Fontagne-Faucher, C.** (2009). Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 57(22), 10889-10897.
- Bourel, G., Henini, S., Krantar, K., Oraby, M., Diviès, C., & Garmyn, D.** (2001). Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. *Lait*, 81(1-2), 75-82.
- Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Oberg, C. J., & Welker, D. L.** (2001). Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 433-439.
- Budge, G. E., Adams, I., Thwaites, R., Piandravalle, S., Drew, G. C., Hurst, G. D. D., Tomkies, V., Boonham, N. & Brown, M.** (2016). Identifying bacterial predictors of honey bee health. *Journal of Invertebrate Pathology*, 141, 41-44.
- Capek, P., Hlavoňová, E., Matulová, M., Mislovicová, D., Růžička, J., Koutný, M., & Keprdová, L.** (2011). Isolation and characterization of an extracellular glucan produced by *Leuconostoc garlicum* PR. *Carbohydrate Polymers*, 83(1), 88-93.
- Ciszek-Lenda, M.** (2011). Biological functions of exopolysaccharides from probiotic bacteria. *Central European Journal of Immunology*, 36(1), 51-55.
- Ciucanu, I., & Kerek, F.** (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131(2), 209-217.
- Clarridge, J. E.** (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840-862.

- Conway, P., Gorbach, S., & Goldin, B.** (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 70(1), 1-12.
- Coppola, S., Fusco, V., Andolfi, R., Aponte, M., Blaiotta, G., Ercolini, D., & Moschandti, G.** (2006). Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples area. *Journal of Dairy Research*, 73(3), 264-272.
- Corona-Hernandez, R. I., Álvarez-Parrilla, E., Lizardi-Mendoza, J., Islas-Rubio, A. R., Rosa, L. A., & Wall-Medrano, A.** (2013). Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(6), 614-628.
- Correia, M. I. T. D., Liboredo, J. C., & Consoli, M. L. D.** (2012). The role of probiotics in gastrointestinal surgery. *Nutrition*, 28(3), 230-234.
- Côté, G. L., & Leathers, T. D.** (2009). Insoluble glucans from planktonic and biofilm cultures of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1), 149-154.
- Cross, M. M.** (1965). Rheology of non-Newtonian fluids: A new flow equation for pseudoplastic systems. *Journal of Colloid Science*, 20(5), 417-437.
- Chanput, W., Mes, J., Vreeburg, R. A. M., Savelkoul, H. F. J. & Wichers, H. J.** (2010). Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food & Function*, 1, 254-261.
- Charteris, W., Kelly, P., Morelli, L., & Collins, J.** (1998). Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5), 759-768.
- Cheftel, J. C., Cheftel, H., & Capont, F. L.** (1988). Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos: Acribia.
- Chenoll, E., Macian, M. C., Elizaquivel, P., & Aznar, R.** (2007). Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. *Journal Applied Microbiology*, 102(2), 498-508.
- Chentouf, F., H., & Benmechernene, Z.** (2013). Isolation and identification of *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk. *African Journal of Microbiology Research*, 7(23), 2961-2969.
- Chudakov, D. M., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A.** (2005). Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo* imaging. *Trends in Biotechnology*, 23(12), 605-613.
- Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., & Simard, R. E.** (1993). Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 166-173

- David, S., van der Rest, M. E., Driessen, A. J., Simons, G., & de Vos, W. M.** (1990). Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the *Lactococcus lactis* citrate permease gene. *Journal of Bacteriology*, 172(10), 5789-5794.
- de Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E.** (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Microbiology*, 23(1), 130-135.
- de Paula, A. T., Jeronymo-Ceneviva, A. B., Silva, L. F., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. M., & Penna, A. L. B.** (2015). *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Annals of microbiology*, 65(2), 899-910.
- de Vos, W. M., & Hugenholtz, J.** (2004). Engineering metabolic highways in *Lactococci* and other lactic acid bacteria. *Trends in Biotechnology*, 22(2), 72-79.
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vaniengelgem, F., & Degeest, B.** (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 687-707.
- De Vuyst, L., & Degeest, B.** (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 153 - 177.
- Degeest, B., Janssens, B., & Vuyst, L. D.** (2001). Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0-1: production kinetics, enzyme activities and EPS yields. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 470-477.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., & Palenzona, D.** (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Landers in Applied Microbiology*, 31(6), 438-442.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., & Hols, P.** (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76(1), 159-184.
- Denis, F., & Ploy, M. C.** (2007). *Bactériologie médicale: Techniques usuelles*: Elsevier Masson.
- Dertli, E., Colquhoun, I. J., Gunning, A. P., Bongaerts, R. J., Le Gall, G., Bonev, B. B., Mayer, M. J. & Narbad, A.** (2013). Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *Journal of Biological Chemistry*. 288(44). 31938–31951.
- Dandrich, H. W., Zon, L. I., Westerfield, M., & Zon, L.** (2004). *The Zebrafish: Cellular and Developmental Biology*. Elsevier Science.100, 1-366
- Devoyod, J., J., & poullain, F.** (1988). Les *Leuconostocs*. Propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Lait*, 68(3), 249-279.
- Devoyod, j. j., & Poullain, F.** (1988). Les *Leuconostocs*. Propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Lait*, 68(3), 249-279.
- Diana, C.-R., Humberto, H.-S., & Jorge, Y. F.** (2015). Probiotic properties of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from aguamiel of agave salmiana. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(2), 107-117.

- Dicks, L. M. T., Van Vuuren, H. J. J., & Dellagli, F.** (1990). Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenm*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions, and DNA-DNA hybridizations *International Journal Of Systematic Bacteriol*, 40(1), 83-91.
- Díez-Municio, M., Montilla, A., Jimeno, M. L., Corzo, N., Olano, A., & Moreno, F. J.** (2012). Synthesis and characterization of a potential prebiotic trisaccharide from cheese whey permeate and sucrose by *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(8), 1945-1953.
- Divya, J. B., Varsha, K. K., & Nampoothiri, K. M.** (2012). Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(5), 1314-1324.
- Dols, M., Chraibi, W., Remaud-Simeon, M., Lindley, N. D., & Monsan, P. F.** (1997). Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2159-2165.
- Domingues, S., Aires, A.C., Mohedano, M.L., López, P., & Arraiano, C.M.** (2013) A new tool for cloning and gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *Plasmid* 70(2), 247-253.
- Donelli, G.** (2016). *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*: Springer International Publishing.
- Dong, Y., Wang, J. W., & Qing, Y.** (2000). Influence of molecular weight of chitin and its three derivatives on critical concentration of lyotropic liquid crystalline phase transition. *Chinese Journal of Polymer Science*, 18(1), 15-17.
- Dong, Y. M., Qiu, W., Ruan, Y., Wu, Y., Wang, M., & Xu, C.** (2001). Influence of molecular weight on critical concentration of chitosan/formic acid liquid crystalline solution. *Journal of Polymer Science*, 33(5), 387-389.
- Dooley, K., & Zon, L. I.** (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genandics & Development*, 10(3), 252-256.
- Dortu, C., & Thonart, P.** (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques and intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société and Environnement*, 13(1), 143-154.
- Douglas, L. C., & Sanders, M. E.** (2008). Probiotics and prebiotics in diandandics practice. *Journal of the American Diandandic Association*, 108(3), 510-521.
- Drici, H., Gilbert, C., Kihal, M., & Atlan, D.** (2010). Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 647-657.
- Du, B., Zeng, H., Yang, Y., Bian, Z., & Xu, B.** (2016). Anti-inflammatory activity of polysaccharide from *Schizophyllum commune* as affected by ultrasonication. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 100-105.

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F.** (1956). Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dueñas, M., Munduate, A., Perea, A., & Irastorza, A.** (2003). Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2,6 in a semidefined medium under different growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1-2), 113-120.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G. & Daly, C.** (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 386-392.
- Elliott, J. A., & Facklam, R. R.** (1993). Identification of *Leuconostoc spp.* by analysis of soluble whole-cell protein patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(5), 1030-1033.
- Emmanuel, C. K., Kalpy-Julien, C., Lessoy, T., Eric, A. E., Bernadandte, G. G., Lamine, N. S., & Mireille, D.** (2017). Probiotic profiling of *Leuconostoc* species isolated from a traditional fermented cassava product. *African Journal of Microbiology Research*, 11(10), 408-413.
- Endo, A., & Okada, S.** (2008). Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(9), 2195-2205.
- Fang, Y., Takahashi, R., & Nishinari, K.** (2004). Rheological characterization of schizophyllan aqueous solutions after denaturation-renaturation treatment. *Biopolymers*, 74(4), 302-315.
- Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., O'Connell Motherway, M., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G. & van Sinderen, D.** (2012). Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6), 2108-2113.
- Fauduand, H.** (2011). *Mécanique des fluides and des solides appliquée à la chimie*: Lavoisier Éd. Tec & Doc.
- Fernández de Palencia, P., Werning, M. L., Sierra-Filardi, E., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Corbí, A. L., & López, P.** (2009). Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)- β -D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14), 4887-4891.
- Fernández, C., irastorza, A., Dueñas, M. & Bilbao, A.** (1996). Characterization and DNA plasmid analysis of ropy *Pediococcus spp.* strains isolated from Basque country ciders. *Journal of food protection*, 58, 76-80.

- Finore, I., Di Donato, P., Mastascusa, V., Nicolaus, B., & Poli, A.** (2014). Fermentation Technologies for the Optimization of Marine Microbial Exopolysaccharide Production. *Marine Drugs*, *12*(5), 3005-3024.
- Flórez, A. B., Campedelli, I., Delgado, S., Alegría, Á., Salvandti, E., Felis, G. E., Mayo, B. & Torriani, S.** (2016). Antibiotic Susceptibility Profiles of Dairy *Leuconostoc*, Analysis of the Genomic Basis of Atypical Resistances and Transfer of Genes In Vitro and in a Food Matrix. *PLoS ONE*, *11*(1), e0145203.
- Fooks, L. J., Fuller, R., & Gibson, G. R.** (1999). Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, *9*(1), 53-61.
- Frantzen, C. A., Kot, W., Pedersen, T. B., Ardö, Y. M., Broadbent, J. R., Neve, H., Hansen, L. H., Dal Bello, F., Østlie, H. M., Kleppen, H. P., Vogensen, F. K. & Holo, H.** (2017). Genomic characterization of dairy associated *Leuconostoc* species and diversity of *Leuconostoc* in undefined mixed mesophilic starter cultures. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 132.
- Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H., & Stiles, M. E.** (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, *47*(1), 1-24.
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A.** (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, *29*(8), 388-398.
- Funane, K., Mizuno, K., Takahara, H., & Kobayashi, M.** (2000). Gene encoding a dextransucrase-like protein in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *64*(1), 29-38.
- Garai-Ibabe, G., Duenas, M. T., Irastorza, A., Sierra-Filardi, E., Werning, M. L., Lopez, P., CORBI, A. L. & Fernandez de Palencia, P.** (2010). Naturally occurring 2-substituted (1,3)-beta-D-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the production of functional foods. *Bioresource Technology*, *101*(23), 9254-9263.
- García-Quintans, N., Blancato, V., Repizo, G., Magni, C., & López, P.** (2008). Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. In: Baltasar, L. P. M., & Pérez-Martínez, G. (Eds), Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications. *Kerala, India Research Signpost*. 3, 65-88.
- García-Quintans, N., Magni, C., de Mendoza, D., & Lopez, P.** (1998). The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacandylactis* is induced by acid stress. *Applied Environmental Microbiology*, *64*(3), 850-857.
- García-Quintans, N., Repizo, G., Martín, M., Magni, C., & Lopez, P.** (2008). Activation of the diacandyl/acandoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacandylactis* CRL264 by acidic growth. *Applied Environmental Microbiology*, *74*(7), 1988-1996.

- García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., & Martínez, B.** (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology*, 21(8), 373-382.
- Garvie, E. I.** (1983). *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* comb. nov. and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33, 118-119.
- Garvie, E. I.** (1986). Gram positive cocci genus *Leuconostoc* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*,: Williams and Wilkins Co Baltimore. 9th edition., 2, 1071 - 1075.
- Gaspar, P., Carvalho, A. L., Vinga, S., Santos, H., & Neves, A. R.** (2013). From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 31(6), 764-788.
- Gasson, M. J.** (1997). Molecular genetics of dairy lactic acid bacteria. In: Law, B. A. (Ed.), *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. Springer. US. 10, 319-340
- Geier, M. S., Butler, R. N., & Howarth, G. S.** (2007). Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 115(1), 1-11.
- Gemelas, L., Degraeve, P., & Demarigny, Y.** (2014). The citrate metabolism in homo- and heterofermentative lab: A selective means of becoming dominant over other microorganisms in complex ecosystems. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 953-969.
- Georges, C., & François-Marie, L.** (2008). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*: Lavoisier.
- Germaine, G. R., & Schachtele, C. F.** (1976). *Streptococcus mutans* dextransucrase: mode of interaction with high-molecular-weight dextran and role in cellular aggregation. *Infection and Immunity*, 13(2), 365-372.
- Ghazi, F., Henni, D. E., Benmechene, Z., & Kihal, M.** (2009). Phenotypic and whole cell protein analysis by SDS-PAGE for identification of dominant lactic acid bacteria isolated from Algerian raw milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 4(1), 78-87.
- Ghita, I., Azzam, A. M., El Sayed, N., El, L., Sadek, Z. I., Abdel-Khalek, A., B., & Emara, A. M.** (2015). Probiotic characteristics of some *Bifidobacteria* and *Leuconostoc* strains and growth behavior of the selected strains with different prebiotics. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(6), 789-802.
- Giaouris, E., Chapot-Chartier, M.-P., & Briandand, R.** (2009). Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *International Journal of Food Microbiology*, 131(1), 2-9.
- Giles-Gómez, M., Sandoval García, J. G., Matus, V., Campos Quintana, I., Bolívar, F., & Escalante, A.** (2016). *In vitro* and *in vivo* probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. *SpringerPlus*, 5(1), 1-10.

- Glöckner, P.** (2008). *Radiation Curing: Coatings and Printing Inks ; Technical Basics, Applications and Trouble Shooting*: Vincentz Nandwork.
- Goh, K. K. T., Haisman, R. D., & Singh, H.** (2005). Examination of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* using confocal laser scanning and scanning electron microscopy techniques. *Journal of Food Sciences*, 70(4), 224-229.
- Gomes, A. M., & Malcata, F. X.** (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10(4), 139-157.
- Guardabassi, L., & Courvalin, P.** (2006). Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance : *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. American Sociandy of Microbiology.
- Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis, J., Le Mair, T., Kaufmann, P. & De Paula, J.** (2008). World Gastroenterology Organisation Practice Guideline: Probiotics and Prebiotics. *South African Gastroenterology Review*, 6(2), 14-25.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., G. de los Reyes-Gavilán, C., & Margolles, A.** (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4, 202.
- Guiraud, J., & Galzy, P.** (1980). *L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires*. Editions de l'Usine nouvelle.
- Guiraud, J. P.** (2003). *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris
- Guo, M., Block, A., Bryan, C. D., Becker, D. F., & Alfano, J. R.** (2012). *Pseudomonas syringae* catalases are collectively required for plant pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 194(18), 5054-5064.
- Habimana, O., Le Goff, C., Juillard, V., Bellon-Fontaine, M.-N., Buist, G., Kulakauskas, S., & Briandand, R.** (2007). Positive role of cell wall anchored proteinase PrtP in adhesion of *Lactococci*. *BMC Microbiology*, 7, 36-36.
- Han, C. D.** (2007). *Rheology and processing of polymeric materials: Polymer Rheology: Volume 1*. Oxford University Press, USA.
- Han, J., Xu, X., Gao, C., Liu, Z., & Wu, Z.** (2016). Levan-producing *Leuconostoc citreum* strain BD1707 and its growth in tomato juice supplemented with sucrose. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(5), 1383-1390.
- Han, S. K., Hong, Y., Kwak, H. L., Kim, E. S., Kim, M. J., Shrivastav, A., Oh, M. H. & Kim, H. Y.** (2014). Identification of lactic acid bacteria in pork meat and pork meat products using SDS-PAGE, 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF mass spectromandry. *Journal of Food Safandy*, 34(3), 224-232.
- Hanniffy, S. B., Peláez, C., Martínez-Bartolomé, M. A., Requena, T., & Martínez-Cuesta, M. C.** (2009). Key enzymes involved in mandhionine catabolism by cheese lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 135(3), 223-230.

- Harutoshi, T.** (2013). *Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria for Food and Colon Health Applications*: INTECH Open Access Publisher.
- Hassan, A. N., Frank, J. F., & Elsoda, M.** (2003). Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 13(9), 755-762.
- Havkin-Frenkel, D., & Dudai, N.** (2016). Biotechnology of flavor production in dairy products. In: Weimer, B. C., Rajan, S. & Ganesan, B (Eds.). *Biotechnology in flavor production*. Blackwell Publishing Ltd. UK. 2, 56-82.
- Hayward, A. C.** (1957). Dandection of gas production from glucose by handerofermentative lactic acid bacteria. *Journal of General Microbiology*, 16(1), 9-15.
- Hemme, D.** (2012). *Leuconostoc and Its Use in Dairy Technology*. In: *Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology, 2ème Edition*. CRC Press. 73-108.
- Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C.** (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467-494.
- Hertzberger, R., Arents, J., Dekker, H. L., Pridmore, R. D., Gysler, C., Kleerebezem, M., & de Mattos, M. J. T.** (2014). H₂O₂ production in species of the *Lactobacillus acidophilus* group: a central role for a novel nadh-dependent flavin reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(7), 2229-2239.
- Hervé, A., Cosandte, G., Michèle, G. B., Fabienne, R. B., & Raphaëlle, T. M.** (2008). *Les bactéries lactiques en œnologie*: Tec & Doc Lavoisier. Paris.
- Hidalgo-Cantabrana, C., López, P., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., Suárez, A., Margolles, A., & Ruas-Madiedo, P.** (2012). Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), 227-237.
- Hidalgo-Cantabrana, C., Ordoñez, I., Ruas-Madiedo, P., & Margolles, A.** (2015). Degenerate PCR primers for dandecting putative priming glycosyltransferase genes in *Bifidobacterium* strains. *Beneficial Microbes*, 6(4), 553-562.
- Hintermann, G., Fischer, H. M., Cramer, R., & Hütter, R.** (1981). Simple procedure for distinguishing CCC, OC, and L forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. *Plasmid*, 5(3), 371-373.
- Holst, O., Moran, A. P., & Brennan, P. J.** (2010). Overview of the glycosylated components of the bacterial cell envelope *Microbial Glycobiology*. Academic Press. San Diego. 1, 1-13.
- Holland, R., & Liu, Q. S.** (2011). *Leuconostoc sp. lactic acid bacteria*. Elsevier .138-142.
- Holland, R., Liu, S. Q., Crow, V. L., Delabre, M. L., Lubbers, M., Bennandt, M., & Norris, G.** (2005). Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal*, 15(6), 711-718.

- Horn, N., Wegmann, U., Dertli, E., Mulholland, F., Collins, S. R. A., Waldron, K. W., Bongaerts, R. J., Mayer, M. J. & Narbad, A.** (2013). Spontaneous mutation reveals influence of exopolysaccharide on *Lactobacillus johnsonii* surface characteristics. *PLoS ONE*, 8(3), e59957.
- Hosseini, S. V., Arlindo, S., Böhme, K., Fernández-No, C., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J.** (2009). Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), 1392-1403.
- Huang, Q., Baum, L. & Fu, W. L.** (2010). Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clinical laboratory*, 56, 149-152.
- Hui, Y. H., & Evranuz, E. Ö.** (2016). Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology, 2ème Edition: CRC Press.
- Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. A. P.** (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 730-739.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C., Hadj Sassi, A., & Deschamps, A.** (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 61(3), 193-197.
- Ibarburu, I., Puertas, A. I., Berregi, I., Rodríguez-Carvajal, M. A., Priando, A., & Dueñas, M. T.** (2015). Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 54-62.
- Ibarburua, I., Aznar, R., Elizaquível, P., García-Quintáns, N., López, P., Munduate, A., Irastorza, A. & Dueñas, M. T.** (2010). A real-time PCR assay for detection and quantification of 2-branched (1,3)- β -D-glucan producing lactic acid bacteria in cider. *International journal of Food*. 143(1-2), 26-31.
- Idoui, T., & Karam, N. E.** (2008). Lactic acid bacteria from Jijel's traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas y Aceites*, 59(4), 361-367.
- Irague, R., Massou, S., Moulis, C., Saurel, O., Milon, A., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., Portais, J. C & Potocki-Véronèse, G.** (2011). NMR-based structural glycomics for high-throughput screening of carbohydrate-active enzyme specificity. *Analytical Chemistry*, 83(4), 1202-1206.
- Isenberg, S. L., Brewer, A. K., Côté, G. L., & Striegel, A. M.** (2010). Hydrodynamic versus size exclusion chromatography characterization of alternan and comparison to off-line MALS. *Biomacromolecules*, 11(9), 2505-2511.
- Jahn, A., & Nielsen, P. H.** (1998). Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Science and Technology*, 37(1), 17-24.
- Jean-Luc, C.** (2013). *Conception des pièces plastiques injectées*. Lavoisier. Paris.

- Jindal, N., Singh, D. P., & Khattar, J. I. S.** (2011). Kinandics and physico-chemical characterization of exopolysaccharides produced by the cyanobacterium *Oscillatoria formosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9), 2139-2146.
- Jini, R., Swapna, H., Amit Kumar, R., Vrinda, R., Halami, P., Sachindra, N., & Bhaskar, N.** (2011). Isolation and characterization of potential lactic acid bacteria (LAB) from freshwater fish processing wastes for application in fermentative utilisation of fish processing waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1516-1525.
- Jung, H. J., Hong, Y., Yang, H. S., Chang, H. C., & Kim, H. Y.** (2012). Distribution of lactic acid bacteria in garlic (*Allium sativum*) and green onion (*Allium fistulosum*) using SDS-PAGE whole cell protein pattern comparison and 16S rRNA gene sequence analysis. *Food Science and Biotechnology*, 21(5), 1457-1462.
- Jung, J. Y., Lee, S. H., & Jeon, C. O.** (2012). Complande genome sequence of *Leuconostoc carnosum* strain JB16, isolated from kimchi. *Journal of Bacteriology*, 194(23), 6672-6673.
- Jung, S. H., Park, J. W., Cho, I. J., Lee, N. K., Yeo, I.-C., Kim, B. Y., Kim, H. K. & Hahm, Y. T.** (2012). Characterization of lactic acid bacteria isolated from sauce-type kimchi. *Preventive Nutrition and Food Science*, 17(3), 217-222.
- Kaialy, W., Khan, U., & Mawlud, S.** (2016). Influence of mannitol concentration on the physicochemical, mechanical and pharmaceutical properties of lyophilised mannitol. *International Journal of Pharmacy*, 510(1), 73-85.
- Kailasapathy, K., & Chin, J.** (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell biology*, 78(1), 80.
- Karimi, R., Mortazavian, A. M., & Da Cruz, A. G.** (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science & Technology*, 91(3), 283-308.
- Katina, K., Maina, N. H., Juvonen, R., Flander, L., Johansson, L., Virkki, L., Tenkanen, M. & Laitila, A.** (2009). In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. *Food Microbiology*, 26(7), 734-743.
- Katz, M., Medina, R., Gonzalez, S., & Oliver, G.** (2002). Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk and cheese. *Journal of Food Protection*, 65(12), 1997-2001.
- Kaur, I. P., Chopra, K., & Saini, A.** (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 1-9.
- Kempler, G. M., & McKay, L. L.** (1979). Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacandylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(2), 316-323.

- Kempler, G. M., & McKay, L. L.** (1980). Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacandylactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(4), 926-927.
- Kempler, G. M., & McKay, L. L.** (1981). Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* ssp. *diacandylactis*. *Journal of Dairy Science*, 64(7), 1527-1539.
- Kenyon, W. J., Esch, S. W., & Buller, C. S.** (2005). The curdlan-type exopolysaccharide produced by *Cellulomonas flavigena* KU forms part of an extracellular glycocalyx involved in cellulose degradation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87(2), 143-148.
- Kihal, M., Henni, D. E., Prevost, H., & Diviès, C.** (2006). A new manometric method for measuring carbon dioxide production by dairy starter culture : a case of *Leuconostoc mesenteroides*. *African Journal of Biotechnology*, 5(4), 378-383.
- Kihal, M., Prevost, H., Henni, D. E., Benmechernene, Z., & Diviès, C.** (2007). Carbon dioxide production by *Leuconostoc mesenteroides* grown in single and mixed culture with *Lactococcus lactis* in skimmed milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 2(2), 62-68.
- Kihal, M., Prevost, H., Henni, D. E., Benmechernene, Z., & Diviès, C.** (2009). Carbon dioxide production by *Leuconostoc mesenteroides* grown in single and mixed culture with *Lactococcus lactis* in skim milk. *Scientific Research and Essay*, 4(11), 1348-1353.
- Kihal, M., Prévost, H., Lhotte, M. E., Huang, D. Q., & Diviès, C.** (1996). Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *Letters in Applied Microbiology*, 22(3), 219-223.
- Kılıç, G. B., Kuleaşan, H., Sömer, V. F., & Akpınar, D.** (2013). Dandermining potential probiotic properties of human originated *Lactobacillus plantarum* strains. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(3), 479-485.
- Kim, D., & Robyt, J. F.** (1994). Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(8), 659-664.
- Kim, T., W., Jung, S., H., Lee, J., Y., Choi, S., K., Park, S., H., Jo, J., S., & Kim, A. Y.** (2003). Identification of lactic acid bacteria in kimchi using SDS-PAGE profiles of whole cell proteins. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(1), 119-124.
- Kim, T., W., Lee, J., Y., Jung, S., H., Kim, Y., M., Jo, J., S., Chung, D., K., Lee, H., J. & Kim, A. Y.** (2002). Identification and distribution of predominant lactic acid bacteria in kimchi, a Korean traditional fermented food. *Journal of microbiology and biotechnology*, 12(4), 635-642.
- Kohro, T., Tanaka, T., Murakami, T., Wada, Y., Aburatani, H., Hamakubo, T., & Kodama, T.** (2004). A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 11(2), 88-97.
- König, H., & Fröhlich, J.** (2009). Lactic acid bacteria. In: König, H., Uden, G., & Fröhlich, J., (Eds.), *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Springer, Berlin Heidelberg. 3-29.

- Kontopoulou, M.** (2011). Applied polymer rheology: polymeric fluids with industrial applications. Wiley. UK.
- Korakli, M., & Vogel, R. F.** (2006). Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesized glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6), 790-803.
- Koseki, S., Mizuno, Y., & Sotome, I.** (2011). Modeling of pathogen survival during simulated gastric digestion. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 1021-1032.
- Koszul, J., & Nabialek, J.** (2004). Viscosity models in simulation of the filling stage of the injection molding process. *Journal of Materials Processing Technology*, 157-158, 183-187.
- Kothari, D., Tingirikari, J. M. R., & Goyal, A.** (2015). *In vitro* analysis of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 for functional food application. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 6(2), 55-61.
- Kralj, S., van Geel-Schutten, G. H., van der Maarel, M., & Dijkhuizen, L.** (2003). Efficient screening methods for glucosyltransferase genes in *Lactobacillus* strains. *Biocatalysis and Biotransformation*, 21(4-5), 181-187.
- Kristiansen, K. A., Potthast, A., & Christensen, B. E.** (2010). Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. *Carbohydrate Research*, 345(10), 1264-1271.
- Kulicke, W. M., & Clasen, C.** (2013). Viscosimetry of Polymers and Polyelectrolytes. Springer Berlin Heidelberg.
- Kulwichit, W., Nilgate, S., Chatsuwat, T., Krajiw, S., Unhasuta, C., & Chongthaleong, A.** (2007). Accuracies of *Leuconostoc* phenotypic identification: a comparison of API systems and conventional phenotypic assays. *BMC Infectious Diseases*, 7(69), 1-8.
- Kumar, M., Ghosh, M., & Ganguli, A.** (2012). Mitogenic response and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from indigenously pickled vegetables and fermented beverages. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 703-711.
- Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachoui, M., & Ouhssine, M.** (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*. 144, 237-250.
- Lacerda, I. C. A., Gomes, F. C. O., Borelli, B. M., Faria Jr, C. L. L., Franco, G. R., Mourão, M. M., Morais, P. B. & Rosa, C. A.** (2011). Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and Minas cheese production using culture-independent 16S rRNA gene sequence analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 650-657.
- Laëtitia, G., Pascal, D., & Yann, D.** (2014). The citrate metabolism in homo- and heterofermentative LAB: A selective means of becoming dominant over other microorganisms in complex ecosystems. *Food and Nutrition Sciences*. 5(10), 953-969.

- Laine, R. A., Esselman, W. J., & Sweeley, C. C.** (1972). Gas-liquid chromatography of carbohydrates. *Methods in Enzymology*, 28, 159-167.
- Larpent, J. P., & Larpent-Gourgaud, M.** (1975). Mémento technique de microbiologie: La cellule bactérienne - métabolisme - systématique - bactéries utiles - milieux de culture and réactifs: *Diffusion Technique and Documentation*. Paris.
- Lasztity, R.** (2009). Food quality and standards - *Volume III*: EOLSS Publishers Company Limited.
- Leathers, T. D., & Bischoff, K. M.** (2011). Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*. *Biotechnology Letters*, 33(3), 517-523.
- Leathers, T. D., & Côté, G. L.** (2008). Biofilm formation by exopolysaccharide mutants of *Leuconostoc mesenteroides* strain NRRL B-1355. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(6), 1025-1031.
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrière, Y., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J.** (2009). Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3554-3563.
- Leblond-Bourgand, N., & Guedon, G.** (2009). Génétique, génomes and transcriptome. In: Drider, D., & Prévost, H., (Eds.), Bactéries lactiques: physiologie, métabolisme, génomique and applications industrielles. *Economica*. Paris. 200-214
- Lee, J.H., Yoon, S.H., Nam, S.H., Moon, Y.H., Moon, Y.Y., & Kim, D.** (2006). Molecular cloning of a gene encoding the sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1149 and the expression in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 612-620.
- Lee, Y. K., & Salminen, S.** (2009). Handbook of Probiotics and Prebiotics. Wiley. UK.
- Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L.** (2013). Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 250-272.
- Leroy, F., & De Vuyst, L.** (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Lewin, B., & Sanlaville, C.** (1998). *Gènes VI*: De Boeck Supérieur.
- Lewus, C. B., & Montville, T. J.** (1991). Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 13(2), 145-150.
- Li, D., Ni, K., Pang, H., Wang, Y., Cai, Y., & Jin, Q.** (2015). Identification and antimicrobial activity detection of lactic acid bacteria isolated from corn stover silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(5), 620-631.
- Li, Q., & Uitto, J.** (2014). Zebrafish as a model system to study skin biology and pathology. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(6), 1-6.

- Lin, T. Y., & Chien, M. F. C.** (2007). Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*, *100*(4), 1419-1423.
- Liu, J. R., Wang, S. Y., Lin, Y. Y., & Lin, C. W.** (2002). Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer*, *44*(2), 183-187.
- Liu, M., Bayjanov, J. R., Renckens, B., Nauta, A., & Siezen, R. J.** (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*, *11*(36), 1-15.
- Liu, M., Nauta, A., Francke, C., & Siezen, R. J.** (2008). Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(15), 4590-4600.
- Liu, S. Q., Holland, R., & Crow, V. L.** (2004). Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal*, *14*(11), 923-945.
- Livesey, G.** (2003). Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. *Nutrition Research Reviews*, *16*(02), 163-191.
- Ljungh, Å., & Wadström, T.** (2009). *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics, Caister Academic. UK.
- Lu, G. T., Ma, Z. F., Hu, J. R., Tang, D. J., He, Y. Q., Feng, J. X., & Tang, J. L.** (2007). A novel locus involved in extracellular polysaccharide production and virulence of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Microbiology*, *153*(3), 737-746.
- Lukášová, J., & Šustáčková, A.** (2003). *Enterococci* and antibiotic resistance. *Acta Veterinaria Brunensis*, *72*, 315-323.
- Lý, M. H. O. N., Cavin, J. F., Cachon, R., L, T. M., Belin, J. M., & Waché, Y.** (2007). Relationship between the presence of the citrate permease plasmid and high electron-donor surface properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacandylactis*. *FEMS Microbiology Letters*, *268*(2), 166-170.
- Maeda, H., Zhu, X., Suzuki, S., Suzuki, K., & Kitamura, S.** (2004). Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B(T). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *52*(17), 5533-5538.
- Maeyama, R., Mizunoe, Y., Anderson, J. M., Tanaka, M., & Matsuda, T.** (2004). Confocal imaging of biofilm formation process using fluoroprobed *Escherichia coli* and fluoro-stained exopolysaccharide. *Journal of Biomedical Materials Research*, *70*(2), 274-282.
- Magni, C., de Felipe, F. L., Sesma, F., López, P., & de Mendoza, D.** (1994). Citrate transport in *Lactococcus lactis* biovar *diacandylactis*: Expression of the plasmid-borne citrate permease P. *FEMS Microbiology Letters*, *118*(1-2), 75-82.
- Mahmoud, K. F., Gibriel, A. Y., Amin, A. A., Nessrien, M. N., Yassien, N. M., & El Banna, H. A.** (2014). Production and characterization of dextranase. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, *3*(9), 1095-1113.

- Maradonna, F., Gioacchini, G., Falcinelli, S., Bertotto, D., Radaelli, G., Olivotto, I., & Carnevali, O.** (2013). Probiotic supplementation promotes calcification in *Danio rerio* larvae: a molecular study. *PLoS ONE*, 8(12), e83155.
- Marchal, N., Bourdon, J. L., & Richard, C.** (1991). Les milieux de culture: pour l'isolement and l'identification biochimique des bactéries. *Lavoisier*. Paris.
- Marino, M., Maifreni, M., & Rondinini, G.** (2003). Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 229(1), 133-140.
- Marshall, V. M., Cowie, E. N., & Morandon, R. S.** (1995). Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC330. *Journal of Dairy Research*, 62(4), 621-628.
- Marshall, V. M., & Rawson, H. L.** (1999). Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International Journal of Food Science & Technology*, 34(2), 137-143.
- Martín, B., Jofré, A., Garriga, M., Pla, M., & Aymerich, T.** (2006). Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6040-6048.
- Martin, M. G., Magni, C., de Mendoza, D., & López, P.** (2005). CitI, a transcription factor involved in regulation of citrate metabolism in lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 187(15), 5146-5155.
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., Fernández, L., & Rodríguez, J. M.** (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*, 143(6), 754-758.
- Martínez-Cánovas, M. J., Quesada, E., Llamas, I., & Béjar, V.** (2004). *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 733-737.
- Martínez-Cuesta, M. D. C., Peláez, C., & Requena, T.** (2013). Menthionine metabolism: major pathways and enzymes involved and strategies for control and diversification of volatile sulfur compounds in cheese. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(4), 366-385.
- Marty-Teyssand, C., Lolkema, J. S., Schmitt, P., Diviès, C., & Konings, W. N.** (1996). The citrate metabolic pathway in *Leuconostoc mesenteroides*: expression, amino acid synthesis, and alpha-ketocarboxylate transport. *Journal of Bacteriology*, 178(21), 6209-6215.
- Mateo, C., Grazu, V., Palomo, J. M., Lopez-Gallego, F., Fernandez-Lafuente, R., & Guisan, J. M.** (2007). Immobilization of enzymes on heterogeneous epoxy supports. *National. Protocols*, 2(5), 1022-1033.
- Mathara, J. M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., Shin, H. K. & Holzappel, W. H.** (2008). Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional

- Maasai fermented milk products in Kenya. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1), 57-64.
- Mathot, A. G., Kihal, M., Prevost, H., & Divies, C.** (1994). Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar media. *International Dairy Journal*, 4(5), 459-469.
- Mauray, S., De Raucourt, E., Chauband, F., MaïGa-Revel, O., Sternberg, C., & Fischer, A. M.** (1998). Comparative anticoagulant activity and influence on thrombin generation of dextran derivatives and of a fucoidan fraction. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 9(4), 373-387.
- Mayeux, J. V., Sandine, W. E., & Elliker, P. R.** (1962). A selective medium for dandecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 45, 655-656.
- Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martín, P., & Bardowski, J.** (2010). Updates in the Mandabolism of Lactic Acid Bacteria. In: Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. R.. (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria*. Wiley-Blackwell. U.K. 3-33.
- Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., Bayer, E. A., & Pessione, E.** (2014). Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnological Advances*, 32(7), 1216-1236.
- McCurdy, R. D., Goff, H. D., Stanley, D. W., & Stone, A. P.** (1994). Rheological properties of dextran related to food applications. *Food Hydrocolloids*, 8(6), 609-623.
- McKay, A. M.** (1993). Microbial carboxylic ester hydrolases (EC 3.1.1) in food biotechnology. *Landters in Applied Microbiology*, 16(1), 1-6.
- Medina, R. B., Katz, M. B., González, S., & Oliver, G.** (2004). Dandermination of esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria. In: Spencer, J. F. T., & Ragout de Spencer, A. L., (Eds.), *Public health microbiology: mandhods and protocols*. Humana Press. Totowa, New Jersey. 465-470.
- Meng, X., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., Yin, H., Gerwig, G. J., & Dijkhuizen, L.** (2016). Structural danderminants of alternating ($\alpha 1 \rightarrow 4$) and ($\alpha 1 \rightarrow 6$) linkage specificity in reuteransucrase of *Lactobacillus reuteri*. *Scientific Reports*, 6, 35261.
- Mezaini, A., Chihib, N.-E., Dilmi Bouras, A., Nedjar-Arroume, N., & Hornez, J. P.** (2009). Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an algerian dairy product. *Journal of Environmental and Public Health*, 2009, 678495.
- Mezger, T. G.** (2014). *The Rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheomanders*, Vincentz Nandwork.
- Milliere, J. B., Mathot, A. G., Schmitt, P., & Divies, C.** (1989). Phenotypic characterization of *Leuconostoc* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 67, 529-542.
- Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., Pinto, D., Siragusa, S., Rizzello, C. G., & Gobbandti, M.** (2010). Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. *Food Microbiology*, 27(7), 897-908.

- Misaki, A., Torii, M., Sawai, T., & Goldstein, I. J.** (1980). Structure of the dextran of *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *Carbohydrate Research*, 84(2), 273-285.
- Mizutani, N., Yamada, M., Takayama, K., & Shoda, M.** (1994). Constitutive mutants for dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77(3), 248-251.
- Monedero, V., Perez-Martinez, G., & Yebra, M. J.** (2010). Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(4), 1003-1015.
- Monsan, P., Bozonand, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.-M., & Remaud-Siméon, M.** (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 675-685.
- Moosavi-Nasab, M., Alahdad, Z., & Nazemi, S. H.** (2010). Characterization of the dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* from date fruit extract. *Iran Agricultural Research*, 27.28(1.2), 79-88.
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Júnior, A. S., & Nero, L. A.** (2013). Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 109-112.
- Moreno, J., Vargas, M. A., Madiedo, J. M., Muñoz, J., Rivas, J., & Guerrero, M. G.** (2000). Chemical and rheological properties of an extracellular polysaccharide produced by the *Cyanobacterium Anabaena* sp. ATCC 33047. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(3), 283-290.
- Moschandti, G., Blaiotta, G., Villani, F., & Coppola, S.** (2000). Specific Dandection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* with DNA Primers Identified by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 422-424.
- Moslehishad, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M. R., Ezzatpanah, H., & Moosavi-Movahedi, A. A.** (2013). The proteolytic activity of selected lactic acid bacteria in fermenting cow's and camel's milk and the resultant sensory characteristics of the products. *International Journal of Dairy Technology*, 66(2), 279-285.
- Mozes, N., Léonard, A., & Rouxhand, P. G.** (1988). On the relations bandween the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochimica and Biophysica Acta -Biomembranes-*, 945(2), 324-334.
- Mozzi, F., Raya, R. R., & Vignolo, G. M.** (2015). *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*. Wiley. U.K.
- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hébert, E. M., Van der Meulen, R., Foulquié Moreno, M. R., Font de Valdez, G., & De Vuyst, L.** (2006). Diversity of handeropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4431-4435.

- Mtshali, P. S., Divol, B., & du Toit, M.** (2012). PCR detection of enzyme-encoding genes in *Leuconostoc mesenteroides* strains of wine origin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1443-1449.
- Mudgil, D., Barak, S., & Khatkar, B. S.** (2014). Guar gum: processing, properties and food applications-A Review. *Journal Food of Science Technology*, 51(3), 409-418.
- Murthy, P. K., Dennis, V. A., Lasater, B. L., & Philipp, M. T.** (2000). Interleukin-10 modulates proinflammatory cytokines in the human monocytic cell line THP-1 stimulated with *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *Infection and Immunity*, 68(12), 6663-6669.
- Nacher-Vazquez, M., Ballesteros, N., Canales, A., Rodriguez Saint-Jean, S., Perez-Priando, S. I., Priando, A., Aznar, R. & Lopez, P.** (2015). Dextrans produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses. *Carbohydrate Polymers*, 125, 292-301.
- Nácher-Vázquez, M., Iturria, I., Zarour, K., Mohedano, M. L., Aznar, R., Pardo, M. Á., & López, P.** (2017). Dextran production by *Lactobacillus sakei* MN1 coincides with reduced autoagglutination, biofilm formation and epithelial cell adhesion. *Carbohydrate Polymers*, 168, 22-31.
- Naessens, M., Cerdobbel, A., Soandaert, W., & Vandamme, E. J.** (2005). *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(8), 845-860.
- Needs, P. W., & Selvendran, R. R.** (1993). Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/mandhyl iodide-mediated carbohydrate mandhylation in dimandhyl sulfoxide. *Carbohydrate Research*, 245(1), 1-10.
- Neef, A., & Sanz, Y.** (2013). Future for probiotic science in functional food and diandary supplement development. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Mandabolic Care*, 16(6), 679-687.
- Neely, W. B., & Nott, J.** (1962). Dextransucrase, an induced enzyme from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochemistry*, 1(6), 1136-1140.
- Neu, H. C., & Gootz, T. D.** (1996). Antimicrobial chemotherapy. In: Baron, S. (Ed.), Medical Microbiology. 4ème Edition. *University of Texas Medical Branch at Galveston*. Texas.
- Ng, S. Y., Koon, S. S., Padam, B. S., & Chye, F. Y.** (2015). Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Malaysian fermented Bambangan (*Mangifera pajang*). *CyTA - Journal of Food*, 13(4), 563-572.
- Ni, K., Wang, Y., Cai, Y., & Pang, H.** (2015). Natural lactic acid bacteria population and silage fermentation of whole-crop wheat. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(8), 1123-1132.
- Notararigo, S., Casas-Engel, M. d. I., Palencia, P. F. d., Corbí, A. L., & López, P.** (2014). Immunomodulation of human macrophages and myeloid cells by 2-substituted (1-3)- β -D-glucan from *P. parvulus* 2.6. *Carbohydrate Polymers*, 112(0), 109-113.

- Notararigo, S., Nacher-Vazquez, M., Ibarburu, I., Werning, M. L., de Palencia, P. F., Duenas, M. T., Aznar, R., Lopez, P. & Priando, A.** (2013). Comparative analysis of production and purification of homo- and handero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 57-64.
- Nuraida, L.** (2015). A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Science and Human Wellness*, 4(2), 47-55.
- Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I.** (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14002-14015.
- Oddo, E., Saiano, F., Alonzo, G., & Bellini, E.** (2002). An investigation of the seasonal pattern of mannitol content in deciduous and evergreen species of the oleaceae growing in northern Sicily. *Annals Botany*, 90(2), 239-243.
- Ofek, I., Hasty, D. L., & Sharon, N.** (2003). Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 38(3), 181-191.
- Olvera, C., Fernandez-Vazquez, J. L., Ledezma-Candanoza, L., & Lopez-Munguia, A.** (2007). Role of the C-terminal region of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ in cell anchoring. *Microbiology*, 153(12), 3994-4002.
- Orla-Jensen, S.** (1921). The main lines of the natural bacterial System. *Journal of Bacteriology*, 6(3), 263-273.
- Ortiz-Rodríguez, E.** (2013). Polymer Rheology, In: Saldívar-Guerra., E. & Vivaldo-Lima., E (Eds.), Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing. *John Wiley & Sons, Inc.* 22, 435-449.
- Osaku, C. A., Sasaki, G. L., Zancan, G. T., & Iacomini, M.** (2002). Studies on neutral exopolysaccharides produced by the ectomycorrhiza *Thelephora terrestris*. *FEMS Microbiology Letters*, 216(2), 145-149.
- Osmanağaoğlu, Ö.** (2007). Dandection and characterization of Leucocin OZ, a new anti-listerial bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* with a broad spectrum of activity. *Food Control*, 18(2), 118-123.
- Palomba, S., Cavella, S., Torrieri, E., Piccolo, A., Mazzei, P., Blaiotta, G., Ventorino, V. & Pepe, O.** (2012). Polyphasic screening, homopolysaccharide composition, and viscoelastic behavior of wheat sourdough from a *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus curvatus* exopolysaccharide-producing starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2737-2747.
- Palles, T., Beresford, T., Condon, S., & Cogan, T. M.** (1998). Citrate mandabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 85(1), 147-154.
- Papagianni, M.** (2012a). Food fermentation and production of biopreservatives. In: Hui, Y. H., & Ozgul, E. E., *Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology*, 2ème Edition CRC Press. US. 6, 109-124.

- Papagianni, M.** (2012b). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3, e201210003.
- Paraschivoiu, I., Prud'homme, M., & Robillard, L.** (2003). *Mécanique des fluides*: Presses internationales Polytechnique.
- Parente, E., & Ricciardi, A.** (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(5), 628-638.
- Park, J. M., Shin, J. H., Lee, D. W., Song, J. C., Suh, H. J., Chang, U. J., & Kim, J. M.** (2010). Identification of the lactic acid bacteria in Kimchi according to initial and over-ripened fermentation using PCR and 16S rRNA gene sequence analysis. *Food Science and Biotechnology*, 19(2), 541-546.
- Pasteur, L.** (1861). On the viscous fermentation and the butyrous fermentation. *Bulletin de la Société Chimique de Paris*, 11, 30-31.
- Patel, A., & Prajapati, J. B.** (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advance in Dairy Research*, 1(2), 107.
- Patel, A. K., Laroche, C., Marcati, A., Ursu, A. V., Jubeau, S., Marchal, L., Pandit, E., Djelveh, G. & Michaud, P.** (2013). Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Bioresource Technology*, 145, 345-350.
- Patel, S., Kothari, D., Shukla, R., Das, D., & Goyal, A.** (2011). Scale up of dextran production from a mutant of *Pediococcus pentosaceus* (SPAm) using optimized medium in a bioreactor. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, 1125-1134.
- Patel, S., Majumder, A., & Goyal, A.** (2012). Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 52(1), 3-12.
- Patel, T. K., & Williamson, J. D.** (2016). Mannitol in plants, fungi, and plant-fungal interactions. *Trends Plant Sciences*, 21(6), 486-497.
- Patra, F., Tomar, S. K., & Arora, S.** (2009). Technological and functional applications of low-calorie sweeteners from lactic acid bacteria. *Journal of Food Sciences*, 74(1), 16-23.
- Patra, F., Tomar, S. K., Rajput, Y. S., & Singh, R.** (2011). Characterization of mannitol producing strains of *Leuconostoc* species. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4), 933-939.
- Pavlova, K., Rusinova-Videva, S., Kuncheva, M., Kratchanova, M., Gocheva, M., & Dimitrova, S.** (2011). Synthesis and characterization of an exopolysaccharide by antarctic yeast Strain *Cryptococcus laurentii* AL100. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(8), 1038-1052.
- Pérez-Ramos, A., Náchter-Vázquez, M., Notararigo, S., López, P., & Mohedano, M. L.** (2015). Current and future applications of bacterial extracellular polysaccharides. In: Preedy, V. R., & Watson, R. R., (Eds.), Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Elsevier Oxford Edition*. UK. 22, 329-344.

- Pérez, G., Cardell, E., & Zárata, V.** (2000). Protein fingerprinting as a complementary analysis to classical phenotyping for the identification of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *Lait*, 80(6), 589-600.
- Pérez, P. F., Minnaard, Y., Disalvo, E. A., & De Antoni, G. L.** (1998). Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 21-26.
- Pandri, D. F. S.** (2015). Xanthan gum: a versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(23), 1-13.
- Pandti, C. A., Polage, C. R., & Schreckenberger, P.** (2005). The Role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 6123-6125.
- Picton, L., Bataille, I., & Muller, G.** (2000). Analysis of a complex polysaccharide (gum arabic) by multi-angle laser light scattering coupled on-line to size exclusion chromatography and flow field flow fractionation. *Carbohydrate Polymers*, 42(1), 23-31.
- Pudlik, A. M., & Lolkema, J. S.** (2012). Rerouting citrate metabolism in *Lactococcus lactis* to citrate-driven transamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6665-6673.
- Pudlik, A. M., & Lolkema, J. S.** (2013). Uptake of alpha-ketoglutarate by citrate transporter CitP drives transamination in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(4), 1095-1101. doi: 10.1128/AEM.02254-12
- Purama, R. K., Goswami, P., Khan, A. T., & Goyal, A.** (2009). Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Carbohydrate Polymers*, 76(1), 30-35.
- Quirasco, M., López-Munguía, A., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., & Farrés, A.** (1999). Induction and transcription studies of the dextransucrase gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5504-5509.
- Rehm, B. H. A.** (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 578-592.
- Reller, L. B., Weinstein, M. P., & Pandti, C. A.** (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases*, 44(8), 1108-1114.
- Remaud-Simeon, M., Willemot, R.-M., Sarçabal, P., Potocki de Montalk, G., & Monsan, P.** (2000). Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(1-3), 117-128.
- Rieu, A., Aoudia, N., Jegou, G., Chluba, J., Yousfi, N., Briandand, R., Deschamps, J., Gasquand, B., Monedero, V., & Garrido, C.** (2014). The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*. *Cellular Microbiology*, 16(12), 1836-1853.
- Robyt, J. F.** (1985). Dextran. *Encyclopedia of Polymer Science*. Wiley-VCH. New York. 4, 753-767.

- Robyt, J. F., & Walsandh, T. F.** (1979). Production, purification, and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydrate Research*, 68(1), 95-111.
- Rokop, Z. P., Horton, M. A., & Newton, I. L. G.** (2015). Interactions between cooccurring lactic acid bacteria in honey bee hives. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7261-7270.
- Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Goffredo, E., Goga, B. T. C., & Paparella, A.** (2016). Influence of incubation conditions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* isolated from dairy products and dairy manufacturing plants. *Italian Journal of Food Safety*, 5(3), 5793.
- Ruas-Madiedo, P.** (2014). Biosynthesis and bioactivity of exopolysaccharides produced by probiotic bacteria. In: Moreno, J. F., & Sanz, M. L. (Eds.). *Food oligosaccharides: production, analysis and bioactivity*. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, UK. 8,118-133.
- Ruas-Madiedo, P., & de los Reyes-Gavilán, C. G.** (2005). Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 843-856.
- Ruas-Madiedo, P., Moreno, J. A., Salazar, N., Delgado, S., Mayo, B., Margolles, A., & de Los Reyes-Gavilán, C. G.** (2007). Screening of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), 4385-4388.
- Ruas-Madiedo, P., N. Salazar, and C.G. de los Reyes-Gavilán.** (2009). Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In: Matthias, U. (ed.), *Bacterial Polysaccharides. Current Innovations and Future Trends*. Caister Academic Press, Norfolk, UK., 16,279-310.
- Ruas-Madiedo, P., Sánchez, B., Cantabrana, C., Margolles, A., & Lás, A.** (2012). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*. In: Hui, E Y. H., & Özgül, E., *Handbook of animal-based fermented food and beverage technology*. CRC Press. UK. 2^{ème} Edition. 7, 125-152.
- Ruas-Madiedo, P., Tuinier, R., Kanning, M., & Zoon, P.** (2002). Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. *International Dairy Journal*, 12, 689-695.
- Rühmkorf, C., Bork, C., Mischnick, P., Rübsam, H., Becker, T., & Vogel, R. F.** (2013). Identification of *Lactobacillus curvatus* TMW 1.624 dextransucrase and comparative characterization with *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106 and *Lactobacillus animalis* TMW 1.971 dextransucrases. *Food Microbiology*, 34, 52-61.
- Ruiz-Matute, A. I., Brokl, M., Sanz, M. L., Soria, A. C., Côté, G. L., Collins, M. E., & Rastall, R. A.** (2011). Effect of dextransucrase cellobiose acceptor products on the growth of human gut bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3693-3700.

- Runft, D. L., Mitchell, K. C., Abuaita, B. H., Allen, J. P., Bajer, S., Ginsburg, K., Neely, M. N. & Withey, J. H.** (2014). Zebrafish as a natural host model for *Vibrio cholerae* colonization and transmission. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1710-1717.
- Russo, P., Iturria, I., Mohedano, M. L., Caggianiello, G., Rainieri, S., Fiocco, D., & Spano, G.** (2015). Zebrafish gut colonization by mCherry-labelled lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99(8), 3479–3490.
- Russo, P., López, P., Capozzi, V., de Palencia, P. F., Dueñas, M. T., Spano, G., & Fiocco, D.** (2012). Banda-Glucans improve growth, viability and colonization of probiotic microorganisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5), 6026-6039.
- Ryan, P. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N. M., & Stanton, C.** (2015). Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food & Function*, 6(3), 679-693.
- Saha, B. C., & Racine, F. M.** (2011). Biotechnological production of mannitol and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 879-891.
- Saitou, N., & Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Salazar, N., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Ruas-Madiedo, P.** (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(9), 1440-1453.
- Salazar, N., Priando, A., Leal, J. A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J. C., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Ruas-Madiedo, P.** (2009). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *Journal of Dairy Sciences*, 92(9), 4158-4168.
- Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Priando, A., Calle, L. P., & de los Reyes-Gavilán, C. G.** (2012). Characterization of exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* NB667 and its cholate-resistant derivative strain IPLA B667dCo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 1028-1035.
- Samelis, J., Maurogenakis, F., & Mandaxopoulos, J.** (1994). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *International Journal of Food Microbiology*, 23(2), 179-196.
- Samot, J., Lebrandon, J., & Badand, C.** (2011). Adherence capacities of oral *Lactobacilli* for potential probiotic purposes. *Anaerobe*, 17(2), 69-72.
- Sánchez, I., Seseña, S., & Palop, L.** (2003). Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of ‘Almagro’ eggplants by SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. *International Journal of Food Microbiology*, 82(2), 181-189.

- Sanlibaba, P., & Çakmak, A. G.** (2016). Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology Open Access*, 2(2), 1000115.
- Santos, M., Teixeira, J., & Rodrigues, A. R.** (2000). Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochemical Engineering Journal*, 4(3), 177-188.
- Saranraj, P., Naidu, M. A., & Sivasakthivelan, P.** (2013). Lactic acid bacteria and its antimicrobial properties: A review. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive*, 4(6), 1124-1133.
- Sarwat, F., Ahmed, N., Aman, A., & Qader, S. A.** (2013). Optimization of growth conditions for the isolation of dextran producing *Leuconostoc spp.* from indigenous food sources. *Pakistan Journal Pharmaceutical Sciences*, 26(4), 793-797.
- Sarwat, F., Qader, S. A. U., Aman, A., & Ahmed, N.** (2008). Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *International Journal of Biological Sciences*, 4(6), 379-386.
- Saugand, M., Valot, B., Bertrand, X. & Hocquand, D.** (2017). Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria? *Trends in Microbiology*, 25, 447-455.
- Scheibler, C.** (1874). Investigation on the nature of the gelatinous excrection (so-called frog's spawn) which is observed in production of beand-sugar juices. *Zeitschrift Fur Versuch-Wesen Deutsche Zucker-Industrie*, 24, 309-335.
- Schleifer, K. H.** (2015). *Leuconostocaceae* fam. nov. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*: John Wiley & Sons, Ltd. UK.
- Schmid, J., Sieber, V., & Rehm, B.** (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6, 496.
- Schmitt, P., & Divies, C.** (1991). Co-metabolism of citrate and lactose by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71(1), 72-74.
- Seseña, S., & Palop, M. L.** (2007). An ecological study of lactic acid bacteria from *Almagro eggplant* fermentation brines. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1553-1561.
- Sesma, F., Gardiol, D., de Ruiz Holgado, A. P., & de Mendoza, D.** (1990). Cloning of the citrate permease gene of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacandylactis* and expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(7), 2099-2103.
- Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., & Singh, R.** (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, 57, 176-195.
- Shehata, M. G., El Sohaimy, S. A., El-Sahn, M. A., & Youssef, M. M.** (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 65-75.
- Shenoy, A. V.** (1999). Rheology of Filled Polymer Systems. *Springer Science & Business Media*. [Berlin, Allemagne](#).

- Shobharani, P., & Agrawal, R.** (2009). Supplementation of adjuvants for increasing the nutritive value and cell viability of probiotic fermented milk beverage. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(6), 70-83.
- Sil, S., Ghosh, A., & Ghosh, T.** (2016). Impairment of blood brain barrier is related with the neuroinflammation induced peripheral immune status in intracerebroventricular colchicine injected rats: An experimental study with mannitol. *Brain Research*, 1646, 278-286.
- Sims, I. M., Frese, S. A., Walter, J., Loach, D., Wilson, M., Appleyard, K., Eason, J., Livingston, M., Baird, M., Cook, G. & Tannock, G. W.** (2011). Structure and functions of exopolysaccharide produced by gut commensal *Lactobacillus reuteri* 100-23. *The Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 5(7), 1115-1124.
- Slodki, M. E., England, R. E., Plattner, R. D., & Dick Jr, W. E.** (1986). Mandhylation analyses of NRRL dextrans by capillary gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research*, 156, 199-206.
- Smid, E. J., & Kleerebezem, M.** (2014). Production of aroma compounds in lactic fermentations. *Annals Reviews of Food Sciences and Technology*, 5(1), 313-326.
- Smit, G., Smit, B. A., & Engels, W. J.** (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 591-610.
- Soandaert, W., Vanhooren, P. T., & Vandamme, E. J.** (1999). The Production of mannitol by fermentation. In: Bucke, C. (Ed.), *Carbohydrate Biotechnology Protocols*. Humana Press. Totowa, NJ. 261-275.
- Sola, L., & Gornung, E.** (2001). Classical and molecular cytogenetics of the zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Cypriniformes): an overview. *Genetica*, 111(1-3), 397-412.
- Sonar, N. R., & Halami, P. M.** (2014). Phenotypic identification and technological attributes of native lactic acid bacteria present in fermented bamboo shoot products from North-East India. *Journal of Food Sciences and Technology*, 51(12), 4143-4148.
- Sorrells, K., & Speck, M.** (1970). Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*. *Journal of Dairy Science*, 53(2), 239-241.
- Spencer, J. F. T., & de Spencer, A. L. R.** (2004). *Environmental Microbiology: Methods and Protocols*: Humana Press. Totowa, NJ.
- Starkey, M., Parsek, M. R., Gray, K. A., & Chang, S. I.** (2004). A Sticky Business: the Extracellular Polymeric Substance Matrix of Bacterial Biofilms. In: Ghannoum, M., & O'Toole, G. A. (Eds.). *Microbial Biofilms*. American Society of Microbiology Press. Washington DC. 10. 174-191.
- Striegel, A. M., Isenberg, S. L., & Côté, G. L.** (2009). An SEC/MALS study of alternan degradation during size-exclusion chromatographic analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(7), 1887-1893.
- Suskovic, J., Brkic, B., Matosic, S., & Maric, V.** (1997). *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain. *Milchwissenschaft*, 52, 430-435.

- Sutherland, I. W.** (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3-9.
- Tamura, K., Panderson, D., Panderson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S.** (2011). MEGA5: molecular evolutionary genandics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony mandhods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Tanasupawat, S., Phoottosavako, M., & Keeratipibul, S.** (2015). Characterization and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(3), 06-12.
- Tanriseven, A., & Doğan, Ş.** (2002). Production of isomalto-oligosaccharides using dextransucrase immobilized in alginate fibres. *Process Biochemistry*, 37(10), 1111-1115.
- Tenover, F. C.** (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, 34(5), 3-10.
- Thierry, A., Pogacic, T., Weber, M., & Lortal, S.** (2016). Production of flavor compounds by lactic acid bacteria in fermented foods. In Mozzi, F., & Raya, R. R. & Vignolo, G. M. (Eds.). *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester*, 16, 314-340.
- Thomas, T. D.** (1973). Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the other bacteria. *Journal of Dairy Sciences and Technology*, 8, 70-71.
- Tieking, M., Kaditzky, S., Valcheva, R., Korakli, M., Vogel, R. F., & Gänzle, M. G.** (2005). Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 692-702.
- Tizzotti, M. J., Sweedman, M. C., Tang, D., Schaefer, C., & Gilbert, R. G.** (2011). New ¹H NMR procedure for the characterization of native and modified food-grade starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 6913-6919.
- Todorov, S. D., LeBlanc, J. G., & Franco, B. D.** (2012). Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 973-984.
- Toldrá, F., Sanz, Y., & Flores, M.** (2001). Meat fermentation technology. In: Hui, Y. H., Nip, W. K. R. R.W. & Owen, A. Y. (Eds.), *Meat science and applications. Marcel Dekker, New York*. 23, 537-561.
- Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubianda, M. J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penadés, J. R. & Lasa, I.** (2001). The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4538-4545.
- Trias, R., Badosa, E., Montesinos, E., & Bañeras, L.** (2008). Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegandables. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1), 91-98.

- Tropcheva, R., Nikolova, D., Evstatieva, Y., & Danova, S.** (2014). Antifungal activity and identification of *Lactobacilli*, isolated from traditional dairy product “katak”. *Anaerobe*, 28, 78-84.
- Tsakalidou, E., Manolopoulou, E., Kabaraki, E., Zoidou, E., Pot, B., Kersters, K., & Kaianizopoulos, G.** (1994). The combined use of whole-cell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional greek dairy products. *System of applied microbiology*, 17, 444-458.
- Tulini, F. L., Hymery, N., Haertlé, T., Le Blay, G., & De Martinis, E. C. P.** (2015). Screening for antimicrobial and proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from cow, buffalo and goat milk and cheeses marketed in the southeast region of Brazil. *Journal of Dairy Research*, 83(1), 115-124.
- Van Calsteren, M. R., Pau-Roblot, C., Bégin, A., & Roy, D.** (2002). Structure dandermination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. *Biochemical Journal.*, 363, 7-17.
- van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E.** (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 187-216.
- van Geel-Schutten, G. H., Flesch, F., ten Brink, B., Smith, M. R., & Dijkhuizen, L.** (1998). Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(6), 697-703.
- van Hijum, S. A. F. T., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., & van Geel-Schutten, I. G. H.** (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 157-176.
- van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Gerwig, G. J., Dijkhuizen, L., & Kamerling, J. P.** (2008a). Structural analysis of bioengineered α -D-glucan produced by a triple mutant of the glucansucrase gtf180 enzyme from *Lactobacillus reuteri* strain 180: generation of (α 1 \rightarrow 4) linkages in a native (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- α -D-glucan. *Biomacromolecules*, 9(8), 2251-2258.
- van Leeuwen, S. S., Kralj, S., van Geel-Schutten, I. H., Gerwig, G. J., Dijkhuizen, L., & Kamerling, J. P.** (2008b). Structural analysis of the α -D-glucan (EPS35-5) produced by the *Lactobacillus reuteri* strain 35-5 glucansucrase GTFA enzyme. *Carbohydrate Research*, 343(7), 1251-1265.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., & Swings, J.** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), 407-438.
- Vaningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J., & De Vuyst, L.** (2004). Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 900-912.

- Vaughan, E. E., David, S., Harrington, A., Daly, C., Fitzgerald, G. F., & De Vos, W. M.** (1995). Characterization of plasmid-encoded citrate permease (citP) genes from *Leuconostoc* species reveals high sequence conservation with the *Lactococcus lactis* citP gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 3172-3176.
- Velasco, S. E., Areizaga, J., Irastorza, A., Dueñas, M. T., Santamaria, A., & Muñoz, M. E.** (2009). Chemical and rheological properties of the β -glucan produced by *Pediococcus parvulus* 2.6. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1827-1834.
- Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Merino, N., Latasa, C., García, B., Ruiz de los Mozos, I., Solano, C., Toledo-Arana, A., Penadés, J. R. & Lasa, I.** (2009). Relevant Role of Fibronectin-Binding Proteins in Staphylococcus aureus Biofilm-Associated Foreign-Body Infections. *Infection and Immunity*, 77(9), 3978-3991. doi: 10.1128/iai.00616-09
- Vandtori, M. H. P. B., Blanco, K. C., Cortezi, M., de Lima, C. J. B., & Contiero, J.** (2012). Dextran: effect of process parameters on production, purification and molecular weight and recent applications. *Diálogos & Ciência*, 31, 171-186.
- Vinderola, C., & Reinheimer, J.** (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9), 895-904.
- Vizoso Pinto, M. G., Franz, C. M. A. P., Schillinger, U., & Holzapfel, W. H.** (2006). *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology*, 109(3), 205-214.
- von Weymarn, N., Hujanen, M., & Leisola, M.** (2002). Production of D-mannitol by handofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, 37(11), 1207-1213.
- Vuillemard, J. C.** (1986). Evolution de l'activité protéolytique des bactéries lactiques. In Doc, T. (Ed.), *Microbiologie des aliments. Lavoisier*. Paris. 3, 1-65.
- Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J.** (2005). *Dairy Science and Technology, Second Edition*: CRC Press. UK.
- Wang, S., Yuan, X., Dong, Z., Li, J., & Shao, T.** (2017). Isolating and evaluating lactic acid bacteria strains for effectiveness on silage quality at low temperatures on the Tibandan Plateau. *Animal Science Journal*, 1-8
- Werning, M. L., Ibarburu, I., Duenas, M. T., Irastorza, A., Navas, J. & Lopez, P.** (2006). *Pediococcus parvulus* gtf gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for specific PCR detection of β -D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. *Journal of Food Protection*, 69, 161-9.
- Werning, M. L., Corrales, M. A., Priando, A., Fernandez de Palencia, P., Navas, J., & López, P.** (2008). Heterologous expression of a position 2-substituted (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 5259-5262.

- Werning, M. L., Notararigo, S., Nácher, M., Fernández de Palencia, P., Aznar, R., & López, P.** (2012). Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In: El-Samragy, Y. (Ed.). Food additives. *Intech*, Croacia: 83-114.
- Widdel, F.** (2007). Theory and measurement of bacterial growth. *Di dalam Grundpraktikum Mikrobiologie*, 4(11). 1-11.
- Wisselink, H. W., Weusthuis, R. A., Eggink, G., Hugenholtz, J., & Grobben, G. J.** (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 151-161.
- Wood, B. J. B., & Holzapfel, W. H. N.** (1995). The genera of lactic acid bacteria. *Springer* US.
- Wozniak, D. J., Wyckoff, T. J. O., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G. A., & Parsek, M. R.** (2003). Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7907-7912.
- Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanandaki, E., & Tzanandakis, N.** (2000). Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as diandary adjuncts. *Food Microbiology*, 17(2), 205-215.
- Xiraphi, N., Georgalaki, M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E., & Drosinos, E. H.** (2008). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Meat Science*, 80(2), 194-203.
- Yadav, R., Puniya, A. K., & Shukla, P.** (2016). Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an indigenous fermented beverage raabadi. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1683.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucandte, C., & Fillmore, S.** (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, 2(48), 1-12.
- Yang, S.-C., Lin, C.-H., Sung, C. T., & Fang, J.-Y.** (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 5, 241.
- Yang, Y. K., Park, S. H., Hwang, J. W., Pyun, Y. R., & Kim, Y. S.** (1998). Cellulose production by *Acanthobacter xylinum* BRC5 under agitated condition. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(3), 312-317.
- Yun, J. W., & Kim, D. H.** (1998). A comparative study of mannitol production by two lactic acid bacteria. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(2), 203-208.
- Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W.** (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56.
- Zahid, N., & Deppenmeier, U.** (2016). Role of mannitol dehydrogenases in osmoprotection of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(23), 9967–9978.
- Zarour, K., Benmechernene, Z., Hadadji, M., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, D. J., & Kihal, M.** (2012). Bioprospecting of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from algerian raw camel

and goat milk for technological properties useful as adjunct starters. *African Journal of Microbiology Research*, 6(13), 3192-3201.

Zhang, H., & Cai, Y. (2014). Lactic acid bacteria: fundamentals and practice. *Springer*. Nandherlands.

Zhang, W., Liu, M., & Dai, X. (2013). Biological characteristics and probiotic effect of *Leuconostoc lactis* strain isolated from the intestine of black porgy fish. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 685-691.

Annexes

Annexe I

Séquences

1- Séquence partielle du gène codant pour l'ARNr 16S de *L. mesenteroides* CM9 (1007 bp) (Numéro d'accèsion dans GenBank KY083048)

TGCTATACATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGCGAACGGGTGAGTA
ACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGT
GTCGCATGACACAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGG
TGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGA
CACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACG
CCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAATGA
TTTTAGTTTACGGTACCATAACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTC
CCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGG
AGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTA
GCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGA
GGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGT
GTTAGGAGGTTTCCGCTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTTCGCTGGGGAGTACGACCGCAAG
GTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA
AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTCTCTTCGAAACAAGTGAC

2- Séquence partielle du gène codant pour l'ARNr 16S de *Lb. sakei* MN1 (1350 bp) (Numéro d'accèsion dans GenBank KJ161303)

GCTATACATGCAAGTCGAACGCACTCTCGTTTAGATTGAAGGAGCTTGCTCCTGATTGATAAACATTTGAGT
GAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTAAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCT
AATACCGCATAAAACCTAACACCGCATGGTGTAGGGTTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTTAGGATGGAC
CCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGACCGTGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTA
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGG
ACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAA
GAATGTATCTGATAGTAACCTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCT
TAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGA
GGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTG
TCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATG
CCGTAAACGATGAGTGTAGGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTT
TCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
GATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCATTCTCAGTTCCGATTGTAGG
CTGCAACTCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC

3- Séquence partielle du gène *dsr* codant la dextrane-saccharase de *L. mesenteroides* CM9 (634 bp)

ACTTTGCTGAGGCTAGAGTCCAATATGTTGCTGGTGGCCAATCGATGTCCGTTGATAGTAATGACGTGTTAA
CAAGTGTTCGCTATGGTAAAGATGCCATGACGGCTTCTGACACTGGAACATCTGAGACGCGTACTGAAGGTA
TTGGAGTCATCGTCAGCAATAACGCGGAGCTACGATTAGAGGATGGGCATACTGTCACATTGCATGTGGGGG
CAGCTCATAAGAACCAAGCTTATCGTGCTTTGTTATCAACAACCTGCAGATGGATTAGCTTATTATGATACTG
ATGAAAATGCACCTGTGGCGTACACAGATGCTAACGGCGATTTGATTTTTACGAATGAATCAATTTATGGTG
TACAAAATCCACAAGTTTCAGGTTACTTGGCAGTTTGGGTTCCGGTAGGTGCGCAACAAGATCAAGATGCAC
GAACGGCCTCTGATAACAACAACACAGAGTGATAAAGTGTTCCATTCAAACGCTGCTCTTGATTCTCAAG
TCATCTACGAAGTTTCTCAAACCTCCAAGCATTGCTACAGACAGCAGTGAATATACAAACGTAGTCATCG
CTCAGAAATGCGGACCAATTTAAGCAATGGGGTGTGACAAGCTTCCAATTGGCACCACA

4- Séquence partielle du gène *dsr* codant la dextrane-saccharase de *Lb. sakei* MN1 (695 bp)

GATGATGGTCAATATATGGCAACTAAGTCACCATATTACGATGCCATCTCAGCGTTGTTGAAAGCCCGTATT
AAGTATGTGGCTGGTGGACAAACCATGGCTGTAGATAAACACGATATCTTAACATCAGTTCGCTTTGGTGAT
GGGATCATGAATGCATCTGATAAGGGTAGCAGCAGCGCCCGTACCCAAGGAATTGGCGTGATTGTCAGCAAT
AATGATGCGTTAGCGTTGAAGGGAGACACTGTGACCCTTCATATGGGTATCGCTCACGCCAACAGGCATAC
CGTGCTTTGTTGTTAACGACGACAGATGGACTAATGAAATACACGTCCGATAATGGCGCGCCAATTCGCTAT
ACGGATGCAAATGGTGACTTGATTTTCACTAGCGCAGACATTAAGGGATACCAAAACGTTGAGGTATCCGGA
TTCTTGTCAGTGTGGGTACCAGTCGGTGCATCCGACACACAGGATGCGCGCGCAACAGGGTCTAGCGCTGCA
AACAAAACCTGGTGACACCTTACATTCAAATGCAGCATTGGACTCAAATGTGATTTATGAAGGTTTTTCTAAT
TTCCAAGAGATGCCAACAACCCACGATGAGTTTACAAACGTAAAGATCGCTCAAATGCTGATTTGTTTAAAG
TCATGGGGTGTGACAAGTTTCCAACCTGCACCACAATATCGTTCAAG

Annexe II

Milieux de cultures et solutions

- **Milieu MRS**

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Polypeptone	10 g
Citrate de sodium	2 g
Acétate de sodium	5 g
Glucose	20 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,25g
MnSO ₄	0,05 g
Agar-Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	6.2

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

- **Milieu M17**

Extrait de levure	2.5 g
Extrait de viande	5 g
Tryptone	2,5 g
Peptone	7,5 g
Acide ascorbique	0,5 g
Lactose	5 g
Glycérophosphate de sodium	19 g
MgSO ₄	0.25 g
Agar-Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,1

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

- **Milieu MSE**

Tryptone	20 g
Gélatine	2.5 g
Extrait de levure	5 g
Saccharose	100 g
Glucose	5 g
Citrate de sodium	1 g

Azide de sodium	0.075 g
Agar-Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

- **Milieu KMK**

Extrait de levure	3 g
Biopolytone	2,5g
Glucose	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	6.6

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé 15 minutes à 121°C. Au moment de l'emploi on ajoute :

1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v)

1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p)

Ces solutions sont stérilisées par filtration sur filtre millipore 0.22 µm et sont conservées à l'obscurité à 4°C.

- **Milieu M16 BCP**

Extrait de levure	2,5 g
Extrait de viande	5 g
Peptone	10 g
Acide ascorbique	0,5 g
Lactose	2 g
L-arginine	4 g
Pourpre de Bromocrésol	0,05 g
Agar-Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	6,8

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

- **Milieu MRS BCP**

MRS (milieu liquide)	1000 mL
Bromocrésol pourpre	0,025 mg
pH	7.0

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

- **Milieu Clark et Lubs**

MRS (milieu liquide)	1000 mL
Bromocrésol pourpre	0,025 mg
pH	7.0

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

- **Milieu Mueller-Hinton**

Infusion de viande de bœuf	3000 cm ³
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar-agar	17 g
pH	7.4

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

- **Milieu Chapman**

Peptone	10g
Extrait de viande	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	0.025g
Agar-Agar	15g
pH	7.4

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

- **Gélose nutritive**

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,4

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

- **Bouillon nutritif**

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,4

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

- **Lait écrémé**

Lait en poudre	110 g
Extrait de levure	3 g
Eau distillée	1000 mL

Autoclavage 110°C pendant 10 minutes

- **Milieu défini CDM (avec 0,8% de glucose (CDMG) ou 0,8% de saccharose (CDMS))**

Pour 1000 mL :

Solution basale	870 mL
❖ K ₂ HPO ₄	2,61 g
❖ KH ₂ PO ₄	2,61 g
❖ Citrate diammoniaque	0,52 g
❖ Acétate de sodium	0,87 g
❖ Cystéine-HCl	0,24 g
❖ Tyrosine	0,26 g
❖ pH	7,0

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Acides aminés	8 mL
❖ Alanine	0,024 g
❖ Arginine	0,012 g
❖ Asparagine	0,035 g
❖ Aspartate	0,041 g
❖ Glutamate	0,049 g
❖ Glutamine	0,038 g
❖ Glycine	0,017 g
❖ Histidine	0,023 g

❖ Isoleucine	0,020 g
❖ Leucine	0,045 g
❖ Lysine	0,044 g
❖ Méthionine	0,012 g
❖ Phénylalanine	0,027 g
❖ Proline	0,067 g
❖ Serine	0,034 g
❖ Thréonine	0,022 g
❖ Tryptophane	0,004 g
❖ Valine	0,032 g
❖ pH	6,5
Filtrage avec un filtre de 0,22 µm	
Solution de sucre 40 % (glucose ou saccharose)	2 mL
Micronutriments	1 mL
❖ Cl ₂ Mg	0,02 g
❖ Cl ₂ Ca	0,003 g
❖ SO ₄ Zn	0,0005 g
Filtrage avec un filtre de 0,22 µm	
Bases azotées	1 mL
Préparer NaOH 0,1 N pour dissoudre les composants suivants :	
❖ Adénine	0,0001 mg
❖ Guanine	0,0001 mg
❖ Xanthine	0,0001 mg
❖ Uracile	0,0001 mg
Filtrage avec un filtre de 0,22 µm	
Vitamines	1 mL
❖ Riboflavine	0,0001 g
❖ Acide lipoïque	0,0015 g
❖ D-Biotine	0,0025 g
❖ Acide folique	0,0001 g
❖ Acide nicotinique	0,0001 g
❖ Na-p-Aminobenzoate	0,0005 g
❖ Pantothénate de calcium	0,0001 g
❖ Pyridoxamine	0,0025 g
❖ Thiamine	0,0001 g
❖ Vitamine B12	0,0001 g
❖ pH	6,5

Filtrage avec un filtre de 0,22 µm

• **Tampon phosphate PBS 1X**

Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,4

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes

Composition de la galerie API 50CH

La composition de la galerie 50 CH est reportée dans la liste des tests ci-dessous :

Bande 0 - 9

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
0		TEMOIN	-
1	GLY	GLYcérol	1,64
2	ERY	ERYthritol	1,44
3	DARA	D-ARAbinose	1,4
4	LARA	L-ARAbinose	1,4
5	RIB	D-RIBose	1,4
6	DXYL	D-XYLose	1,4
7	LXYL	L-XYLose	1,4
8	ADO	D-ADOnitol	1,36
9	MDX	Méthyl-βD-Xylopyranoside	1,28

Bande 10 - 19

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
10	GAL	D-GALactose	1,4
11	GLU	D-GLUcose	1,56
12	FRU	D-FRUctose	1,4
13	MNE	D-MaNnose	1,4
14	SBE	L-SorBose	1,4
15	RHA	L-RHAmnose	1,36
16	DUL	DULcitol	1,36
17	INO	INOsitol	1,4
18	MAN	D-MANnitol	1,36
19	SOR	D-SORbitol	1,36

Bande 20 - 29

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
20	MDM	Méthyl-αD-Mannopyranoside	1,28
21	MDG	Méthyl-αD-Glucopyranoside	1,28
22	NAG	N-AcétylGlucosamine	1,28
23	AMY	AMYgdaline	1,08
24	ARB	ARButine	1,08
25	ESC	ESCuline citrate de fer	1,16 0,152
26	SAL	SALicine	1,04
27	CEL	D-CELLobiose	1,32
28	MAL	D-MALTose	1,4
29	LAC	D-LACTose (origine bovine)	1,4

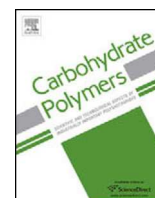
Bande 30 - 39

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
30	MEL	D-MELibiose	1,32
31	SAC	D-SACcharose	1,32
32	TRE	D-TREhalose	1,32
33	INU	INULine	1,28
34	MLZ	D-MéLéZitose	1,32
35	RAF	D-RAFFinose	1,56
36	AMD	AmiDon	1,28
37	GLYG	GLYcoGène	1,28
38	XLT	XyLiTol	1,4
39	GEN	GENTIbiose	0,5

Bande 40 - 49

Tube	Test	Composants actifs	QTE (mg/cup.)
40	TUR	D-TURanose	1,32
41	LYX	D-LYXose	1,4
42	TAG	D-TAGatose	1,4
43	DFUC	D-FUCose	1,28
44	LFUC	L-FUCose	1,28
45	DARL	D-ARAbitoL	1,4
46	LARL	L-ARAbitoL	1,4
47	GNT	potassium GlucoNaTe	1,84
48	2KG	potassium 2-CétoGluconate	2,12
49	5KG	potassium 5-CétoGluconate	1,8

Annexe III



Rheology and bioactivity of high molecular weight dextrans synthesised by lactic acid bacteria



Kenza Zarour^{a,b}, M^a Goretli Llamas^{a,c}, Alicia Prieto^a, Patricia Rúas-Madiedo^d,
María Teresa Dueñas^c, Pilar Fernández de Palencia^a, Rosa Aznar^{e,f}, Mebrouk Kihal^b,
Paloma López^{a,*}

^a Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

^b Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Es Senia, 31100 Oran, Algeria

^c Departamento de Química Aplicada, Facultad de Química, Universidad del País Vasco, 20018 San Sebastián, Spain

^d Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), CSIC, Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain

^e Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), CSIC, Av. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Spain

^f Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Av. Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 December 2016

Received in revised form 24 June 2017

Accepted 28 June 2017

Available online 29 June 2017

Keywords:

Exopolysaccharides

Dextran

Lactic acid bacteria

Leuconostoc mesenteroides

Rheological properties

Immunomodulation

Adhesion

ABSTRACT

Dextrans synthesised by three *Leuconostoc mesenteroides* strains, isolated from mammalian milks, were studied and compared with dextrans produced by *Lc. mesenteroides* and *Lactobacillus sakei* strains isolated from meat products. Size exclusion chromatography coupled with multiangle laser light scattering detection analysis demonstrated that the dextrans have molecular masses between 1.74×10^8 Da and 4.41×10^8 Da. Rheological analysis of aqueous solutions of the polymer revealed that all had a pseudo-plastic behaviour under shear conditions and a random, and flexible, coil structure. The dextrans showed at shear zero a difference in viscosity, which increased as the concentration increased. Also, the purified dextrans were able to immunomodulate *in vitro* human macrophages, partially counteracting the inflammatory effect of *Escherichia coli* O111:B4 lipopolysaccharide.

During prolonged incubation on a solid medium containing sucrose, dextran-producing bacteria showed two distinct phenotypes not related to the genus or species to which they belonged. Colonies of *Lc. mesenteroides* CM9 from milk and *Lb. sakei* MN1 from meat formed stable and compact mucoid colonies, whereas the colonies of the other three *Leuconostoc* strains became diffuse after 72 h. This differential behaviour was also observed in the ability of the corresponding strains to bind to Caco-2 cells. Strains forming compact mucoid colonies showed a high level of adhesion when grown in the presence of glucose, which decreased in the presence of sucrose (the condition required for dextran synthesis). However no influence of the carbon source was detected for the adhesion ability of the other *Lc. mesenteroides* strains, which showed variable levels of binding to the enterocytes.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: C*, critical concentration for interaction between dextran molecules; CDMS, CDM define medium lacking glucose and supplemented with 0.8% sucrose; cfu, colony forming unit; CM9, CM30, SM34 and RTF10, *Leuconostoc mesenteroides* strains; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle medium; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EPS, exopolysaccharide; $\dot{\gamma}$, shear rate; HePS, heteropolysaccharides; HoPS, homopolysaccharides; HPLC, high-performance liquid chromatography; LAB, lactic acid bacteria; LPS, lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4; MRSG, Man Rogosa Sharpe broth containing 2% glucose; MRSS, MRS medium containing 2% sucrose instead of glucose; MSE, Mayeux Sandine Elliker medium; η_0 , viscosity at near-zero shear rate; η , apparent viscosity; PBS, phosphate-buffered saline; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; SEC-MALLS, size exclusion chromatography coupled to multiangle laser light scattering detection; PMA-THP-1, THP-1 monocytes differentiated to macrophages with PMA; TEM, transmission electron microscopy.

* Corresponding author.

E-mail address: plg@cib.csic.es (P. López).

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are a heterogeneous group of gram-positive bacteria, traditionally used in food fermentation and preservation (Gaspar, Carvalho, Vinga, Santos, & Neves, 2013). Currently, their usage has been expanded to the manufacture of functional food, as efficient microbial cell factories for production of industrially relevant metabolites and as probiotics that impact general health and well-being (Mozzi, Raya, & Vignolo, 2015). The positive contribution of LAB to functional food manufacture is assured by the production of beneficial compounds such as lactic acid, carbon dioxide, aroma compounds, vitamins, antimicrobial agents, polyols and exopolysaccharides (EPS) (Nuraida, 2015). The latter bio-products are synthesised by some LAB and remain associated with the cell surface constituting a capsule, or released as a free polymer into the environment (Nwodo, Green, & Okoh, 2012). The LAB EPS can differ according to their chemical structure, molecular mass and linkage types, which could modulate their biological functionality (Surayot et al., 2014). According to monomeric composition, EPS are classified into two groups: homopolysaccharides (HoPS) contain a single type of monosaccharide and heteropolysaccharides (HePS), which are composed of repeated units of at least two types of monosaccharides and various types of linkages (Patel, Majumder, & Goyal, 2012).

The HoPS can be α -D-glucans, β -D-glucans or β -D-fructans and they are respectively synthesized by glucansucrases, glycosyltransferases or fructansucrases (Pérez-Ramos et al., 2015; Werning et al., 2012). HoPS are able to modulate rheological properties of materials (Welman & Maddox, 2003), and several studies have shown that they can replace or reduce the use of more expensive hydrocolloids and could find applications such as texturizing agents (Bounaix et al., 2009). Dextran is a HoPS composed of a main linear chain of α -1,6 glycosidic linkages with a few branches of α -glucopyranose at positions O-2, O-3 or O-4. This biodegradable polymer is synthesised by LAB mainly belonging to the *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* genera (Cizek-Lenda, 2011; Patel et al., 2012). Its yield is affected by environmental conditions, biosynthetic pathways and rate of microbial growth (Sarwat, Ahmed, Aman, & Qader, 2013). Dextrans have various uses in the food, pharmaceutical and oil drilling industries (Aman, Siddiqui, & Qader, 2012). This wide spectrum of applications is due to physicochemical differences such as their molecular mass, which influences the viscosity and rheological properties of the polymer solution. Dextrans of high molecular mass are used for petroleum recovery; those of average molecular masses are employed in the chemical industry; whereas low-molecular mass dextrans find applications in the pharmaceutical and photographic industries (Vettori, Blanco, Cortezi, de Lima, & Contiero, 2012). In cosmetics, they are used as moisturizers and thickeners (Vu, Chen, Crawford, & Ivanova, 2009), and in the food industry, they are added to bakery products and confectionery to improve softness or moisture retention, to prevent crystallisation, and to increase viscosity, rheology, texture and volume (Pérez-Ramos et al., 2015). These HoPS also play an important role in stabilisation of frozen foods and can be used as films, to preserve the surface of fish, meat, vegetables or cheese from oxidation and other chemical changes (Harutoshi, 2013). In the medical field, dextrans are broadly used as blood plasma replacers/expanders and as heparin substitutes, for anticoagulant therapy. They can also produce iron dextrans, which are used in solution for treatment of human and veterinary anaemic deficiency. In addition, dextran sulphate has also shown an antiviral effect against the human immunodeficiency virus (Piret et al., 2000), and we have recently demonstrated that dextrans synthesized by LAB have potential as antivirals and immunomodulatory agents in trout (Nácher-Vázquez et al., 2015). Thus, dextrans can be used in the future for the manufacture of functional food and feed.

In the present work, we have performed a physicochemical characterization, and analysed the rheological properties, of dextrans produced by several strains of *Leuconostoc* and *Lactobacillus* isolated from food. Two physiological aspects were then tested *in vitro* for (i) the ability of the purified dextrans to immunomodulate human macrophages and, (ii) the influence of the dextrans on the ability of the producing LAB to interact with human enterocytes.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Five LAB strains were used in this work. Three of them were isolated in Algeria: CM9 and CM30 from camel milk and SM34 from sheep milk. They were isolated using agar plates containing the MSE medium (Mayeux, Sandine, & Elliker, 1962) supplemented with 10% sucrose and vancomycin ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$) at 30°C for 72 h. These bacteria were identified as *Leuconostoc mesenteroides* (accession number in GenBank: KY083048 (CM9), KY082929 (CM30) and KY083047 (SM34)) by sequencing their 16S rRNA coding genes at Secugen (Madrid, Spain). The other two LAB were *Lactobacillus sakei* MN1, (CECT 8329) and *Lc. mesenteroides* RTF10, both isolated from meat products (Chenoll, Macian, Elizaquivel, & Aznar, 2007). LAB were grown at 30°C in MRS (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960) containing 2% glucose (MRSG) or in MRS supplemented with 2% sucrose (MRSS) instead of glucose. For long-term storage at -80°C , MRSG supplemented with 20% (v/v) glycerol was used. For EPS production, LAB were grown in defined CDM medium (Sánchez et al., 2008) supplemented with 0.8% sucrose (CDMS).

2.2. Production, purification, quantification and characterization of EPS

For production, LAB were precultured at 30°C in MRSS to $A_{600} = 2.0$. Then, the bacteria were sedimented by centrifugation ($12,000 \times g$, 10 min, 4°C), resuspended in the same volume of fresh MRSS, diluted 1:100 in fresh CDMS medium and, incubated at 30°C until the end of the exponential phase of growth. For EPS isolation and purification, cells were removed by centrifugation ($10,651 \times g$, 30 min, 4°C). The EPS was precipitated by addition of cold absolute ethanol to the supernatant (v/v) and storage at 4°C for 24 h. After centrifugation ($10,651 \times g$, 60 min, 4°C), the sediment was air dried, dissolved in distilled water and dialysed for 3 days against ultrapure water, using a 12–14 kDa cut-off membrane. Then, the EPS was frozen at -80°C and lyophilised until dry. Fractionation by size exclusion chromatography (SEC) was performed as previously described (Notararigo et al., 2013), as the final step of purification.

The concentration of EPS at each step of purification was determined by the phenol-sulphuric acid method, using a glucose calibration curve, (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956). The amount of EPS present in the cultures supernatants was determined after their precipitation with three volumes of absolute ethanol and two washes with 80% (v/v) ethanol. During purification and after chromatographic fractionation, the EPS concentrations were determined in aqueous solutions at 2 mg mL^{-1} . In parallel, tests for detection of potential contaminants (DNA, RNA and proteins) were carried out using specific fluorescent staining kits and the Qubit[®] 2.0 fluorometric detection methods (ThermoFisher Scientific) in the same solutions. This technique allows the detection of more than $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of DNA, 20 ng mL^{-1} of RNA, and $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of proteins.

The chemical characterisation of EPS was performed by: (i) determination of monosaccharide composition and phosphate content, (ii) methylation analysis and (iii) infrared (IR) spectroscopy as previously described (Notararigo et al., 2013).

2.3. Molar mass distribution of dextrans by SEC-MALLS

The molar mass distribution of the purified dextrans was analysed by SEC-MALLS as previously reported (Nikolic et al., 2012). In short, each lyophilised dextran sample was resuspended (5 mg mL^{-1}) in 0.1 M NaNO_3 , kept overnight under gentle stirring and centrifuged ($10,000 \times g$, 10 min) before analysis. The HPLC system (Waters, Milford, MA, USA) consisted of a separation module Alliance 2695 connected with three detectors: a photodiode array (PDA 996, Waters) checked at 280 nm for protein detection, a refractive index (RI 2414, Waters) to determine the amount of dextran using calibration curves obtained from standards of different molar mass and the MALLS Dawn Heleos II (Wyatt Europe GmbH, Dembach, Germany). Dextrans were quantified using Empower software (Waters) and the molar mass distribution analysis using Astra 3.5 software (Wyatt Europe GmbH). Two SEC columns placed in series were used: TSK-Gel G3000 PW_{XL}+TSK-Gel G5000 PW_{XL} protected with a TSK-Gel guard column (Supelco-Sigma St. Louis, MO, USA) and the separation was carried out at 40°C with a flow rate of 0.45 mL min^{-1} using 0.1 M NaNO_3 as mobile phase.

2.4. Rheological analysis

For determination of the rheological behaviours of dextran solutions the lyophilised EPS were dissolved in ultrapure water at different concentrations. The solutions were prepared at room temperature to avoid denaturation and were kept in the rest state before each analysis. Rheological measurements were made in a Thermo-Haake RheoStress 1 viscoelastometer (ThermoFisher Scientific), equipped with a cone-plate (60 mm diameter, 2° cone angle). All measurements were performed using two steps after sample loading (2 mL): first the sample was maintained at the desired temperature for 3 min without shear and, secondly, the shear-rate was increased from 1 to 500 s^{-1} within 3 min . Each experiment was repeated at least three times. Continuous steady-state flow behaviour was determined from the apparent viscosity and shear rate relationship data using Haake RheoWin Data Manager. Viscosity at shear near to zero (η_0) was extrapolated and regressed using the Cross model (Cross, 1965):

$$\eta = \eta_0 / (1 + (\lambda \cdot \dot{\gamma})^{1-n}) \quad (1)$$

where ' η ' is the apparent viscosity, ' λ ' is a time constant related to the relaxation times of the polymer in solution, ' $\dot{\gamma}$ ' is shear rate and ' n ' is the power law flow behaviour index.

Variation of viscosity (η_0) as a function of dextran concentration (C) was determined using the following power law equation:

$$\eta_0 = k \cdot c^b \quad (2)$$

Where ' b ' and ' k ' are the constants to be determined from the log-log plot of viscosity versus dextran concentration.

2.5. THP-1 cell line culture and immunomodulation assay

The human monocytic leukemia cell line THP-1, obtained from the cell bank at Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, Madrid, Spain) was used. The cells were grown in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco), penicillin (100 U mL^{-1}) and streptomycin ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) at 37°C in an atmosphere containing 5% CO_2 . Cells were sub-cultured every 2 days. The mature macrophage-like state was induced by treating the THP-1 monocytes ($10^6 \text{ cells mL}^{-1}$) with 40 nM of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) for 72 h in 12-well cell culture plates (Falcon-Software, Canada) with 1 mL cell suspension in each well, using the above RPMI 1640 supplemented medium. Differentiated, plastic-adherent cells were washed twice with the same medium without PMA and incubated

for 24 h at 37°C . Then, the PMA-THP-1 cells were co-stimulated with 700 ng mL^{-1} of the *Escherichia coli* O111:B4 lipopolysaccharides (LPS, Sigma) and with the purified dextrans ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 18 h in the same conditions of incubation (Chanput, Mes, Vreeburg, Savelkoul, & Wichers, 2010). Cell-free culture supernatants were collected and stored at -80°C to analyse the concentration of the secreted pro-inflammatory TNF- α and the anti-inflammatory IL10 cytokines using commercially available ELISA kits (BD OptEIA™; BD biosciences, USA) as indicated by the manufacturers. The THP-1 monocytes (un-differentiated cells) and the supplemented medium were used as controls. In this experiment, also, three commercial dextrans (T10, T40 and T2000; Pharmacia Biotechnology AB, Sweden) were analysed. The experiments were performed in triplicate.

2.6. Location of EPS production at cellular level

For phenotypic determination at cellular level, LAB cultures were grown in MRSG liquid medium to $A_{600} = 1$. Then, $100 \mu\text{L}$ of appropriate dilutions were streaked on MRSS and MRSG agar plates and incubated for the time indicated in the results section. To detect EPS location by transmission electron microscopy (TEM), one colony of each strain from MRSS-agar was carefully suspended in $50 \mu\text{L}$ of sterile distilled water to form a suspension, that was subjected to negative staining as described previously (Maeyama, Mizunoe, Anderson, Tanaka, & Matsuda, 2004). To visualise EPS preparations, aqueous solutions at 30 mg mL^{-1} were subjected to negative staining. Glow-discharged carbon-coated Formvar grids were used and, immediately prior to use, the grids were subjected to ionic discharge for one minute. Then, they were placed facedown over a droplet of each suspension. After 30 s , each grid was removed, washed, blotted briefly with filter paper, negatively stained with 2% uranyl acetate, blotted quickly and air-dried. Samples were examined using a JEOL 1230 microscope operated at 100 kV at the Electron Microscopy service of Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, Madrid, Spain).

2.7. Caco-2 cell culture and adhesion assays

The Caco-2 human enterocyte cell line, obtained from the cell bank at CIB, were seeded in 96-well tissue culture plates (Falcon Microtest™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) at a final concentration of $1.25 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ and grown as monolayers of differentiated and polarised cells for 21 days as previously described (Nácher-Vázquez et al., 2017). Cell concentrations were determined as previously described (Garai-Ibabe et al., 2010).

For the adhesion assays, exponential-phase LAB cultures grown in either MRSG or MRSS were sedimented by centrifugation ($12,000 \times g$, 10 min , 4°C), resuspended in the appropriate volume of either Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen) containing 0.5% glucose (G) or DMEM supplemented with 0.5% sucrose (S) to give a final concentration of $1.25 \times 10^6 \text{ cfu mL}^{-1}$. 0.1 mL of bacterial suspension was added per well (ratio 10:1, bacteria:Caco-2 cells) and the plates were incubated for 1 h at 37°C . Then, un-adhered bacteria were removed and, the cell-associated bacteria quantified after plating onto MRSG plates, as previously described (Nácher-Vázquez et al., 2017). All adhesion assays were conducted in triplicate.

2.8. Statistical analysis

In the adhesion analysis, data are expressed as a mean \pm standard deviation calculated from three independent replications performed in triplicate. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) by using the SAS software. Tukey's test was employed to determine the significant differences

between the variables at $p \leq 0.05$. In the immunomodulation experiments, data are expressed as a mean \pm standard deviation calculated from one replication in triplicate. Data were subjected to ANOVA by using the SAS software. Dunnett's test was employed to determine the significant differences between the control group and the various treatment groups. Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

3. Results

3.1. Characterization of dextrans produced by LAB

Three *Lc. mesenteroides* strains (CM9, SM34, CM30) isolated from Algerian milks and selected for abundant production of EPS in the presence of sucrose but not with glucose (Table 1S) were compared with two previously characterised dextran-producing bacteria, *Lc. mesenteroides* RTF10 and *Lb. sakei* MN1 isolated from Spanish fermented meat (Notararigo et al., 2013; N acher-V azquez et al., 2015, 2017). LAB were grown in CDM defined medium instead of a rich medium in order to avoid, or diminish, the co-precipitation of interfering compounds during EPS quantification and further purification (Montersino, Prieto, Muñoz, & Rivas, 2008; Notararigo et al., 2013). The medium was supplemented with 0.8% sucrose. This relatively low concentration of the predicted substrate for EPS synthesis was chosen to avoid viscosity problems during purification. Quantification of the EPS present in the culture supernatants by the phenol sulphuric acid method, revealed the concentrations of the polymers, namely: for *Lc. mesenteroides* CM9, CM30, SM34 and RTF10 strains, respectively, $1.47 \pm 0.08 \text{ g L}^{-1}$, $2.15 \pm 0.15 \text{ g L}^{-1}$, $3.14 \pm 0.06 \text{ g L}^{-1}$ and $1.25 \pm 0.11 \text{ g L}^{-1}$ and for *Lb. sakei* MN1 $1.72 \pm 0.12 \text{ g L}^{-1}$. The estimated yield of the production varied among the different bacteria, with the highest being SM34 EPS and the lowest being RTF10 EPS (Table 1).

In all cases a purity higher than 95% was detected when the concentration of the potential contaminants DNA, RNA and proteins was measured (Table 1). Ethanol precipitation (v/v) was used for the recovery of high molecular weight EPS and their initial purification from the supernatants of the cultures, followed by dialysis of EPS solutions as an intermediate purification step. This treatment allowed a recovery of the EPS (68–87%), eliminated the contaminant DNA and RNA, and only residual levels of proteins (0.1–0.25%) were detected (Table 1). This degree of purity was deemed sufficient for further physicochemical studies but for immunomodulation experiments (see below) the EPS were further purified by SEC to remove the protein contaminants (Table 1). Depending on the strain considered, *Lc. mesenteroides* has been reported to produce three types of extracellular HoPS using sucrose as substrate: dextran and alternan (α -glucans) or levan (β -fructan) (Harutoshi, 2013; Sanlibaba &  akmak, 2016). Thus, to determine, which type of HoPS was produced by *Lc. mesenteroides* CM30, SM34 and CM9 strains, monosaccharide composition analysis was carried out. The results (data not shown) demonstrate that all EPS produced were glucan, composed strictly of glucose units. In addition, IR spectra of the three HoPS preparations presented the same profile (Fig. 1A) and they were typical of α -linked polymers, with absorption bands between 847 and 849 cm^{-1} and 913 – 917 cm^{-1} which correspond to α -anomers (Notararigo et al., 2013; Park, Ahn, Kim, & Chung, 2013; Vettori, Franchetti, & Contiero, 2012).

Methylation analysis showed that the three HoPS had a main chain of glucopyranose units with α -(1,6) linkages (between 86.7% and 89.4%) and partially branched in the O-3 position by a single α -glucopyranose unit (between 8.5% and 10.3%) (Fig. 1B). Therefore, the overall data revealed that the polymers from the three *Lc. mesenteroides* strains are dextran with the structure depicted in Fig. 1C, very similar to that of the dextrans produced by MN1 and

Table 1
Analysis of the EPS yield during purification and determination of their molecular masses.

Molecules	Samples												
	Supernatant			After precipitation and dialysis			After chromatographic fractionation			After chromatographic fractionation			
	EPS yield (mg L ⁻¹ /A ₆₀₀)	Protein (mg L ⁻¹)	DNA (mg L ⁻¹)	RNA (mg L ⁻¹)	EPS RC (%)	Protein (mg L ⁻¹)	DNA (mg L ⁻¹)	RNA (mg L ⁻¹)	EPS RC (%)	Protein (mg L ⁻¹)	DNA (mg L ⁻¹)	RNA (mg L ⁻¹)	Molecular mass (Da)
Strains													
CM9	452.30	48.87	3.60	0.40	75.17	2.13	ND	ND	56.84	ND	ND	ND	2.3×10^8
CM30	757.04	106.93	0.71	0.27	70.46	7.46	ND	ND	46.74	ND	ND	ND	3.9×10^8
SM34	1341.88	63.80	0.62	ND	67.67	5.86	ND	ND	46.36	ND	ND	ND	2.1×10^8
RTF10	395.57	52.53	0.23	ND	86.80	2.53	ND	ND	60.89	ND	ND	ND	4.4×10^8
MN1	414.45	66.13	0.37	ND	83.43	6.00	ND	ND	61.40	ND	ND	ND	1.7×10^8

Bacteria were grown in CDM at the end of the exponential phase (A₆₀₀ of 3.25, 2.84, 2.34, 3.16 for *Lc. mesenteroides* CM9, CM30, SM34 and RTF10 strains respectively, and to A₆₀₀ = 4.15 for *Lb. sakei* MN1) and, the concentration of the EPS and contaminants (proteins, DNA and RNA) present in the culture supernatants and after the steps of purification was determined.

ND indicates levels below the limit of detection corresponding to $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of DNA, 20 mg mL^{-1} of RNA and $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of proteins.

^a The concentration of proteins, DNA and RNA was measured directly in the supernatants. EPS concentration was determined after precipitation from the supernatants with three volumes of ethanol.

^b The concentrations of the biomolecules were determined from preparations of the freeze-dried compounds at a concentration of 2 mg mL^{-1} dissolved in water.

^c The yield of EPS was calculated as the ratio of the total amount of the polymer (indicated in the text) and the bacterial biomass estimated from the final A₆₀₀ of the cultures.

^d The recovery (RC) of EPS is expressed as percentage of the EPS present in the culture supernatants.

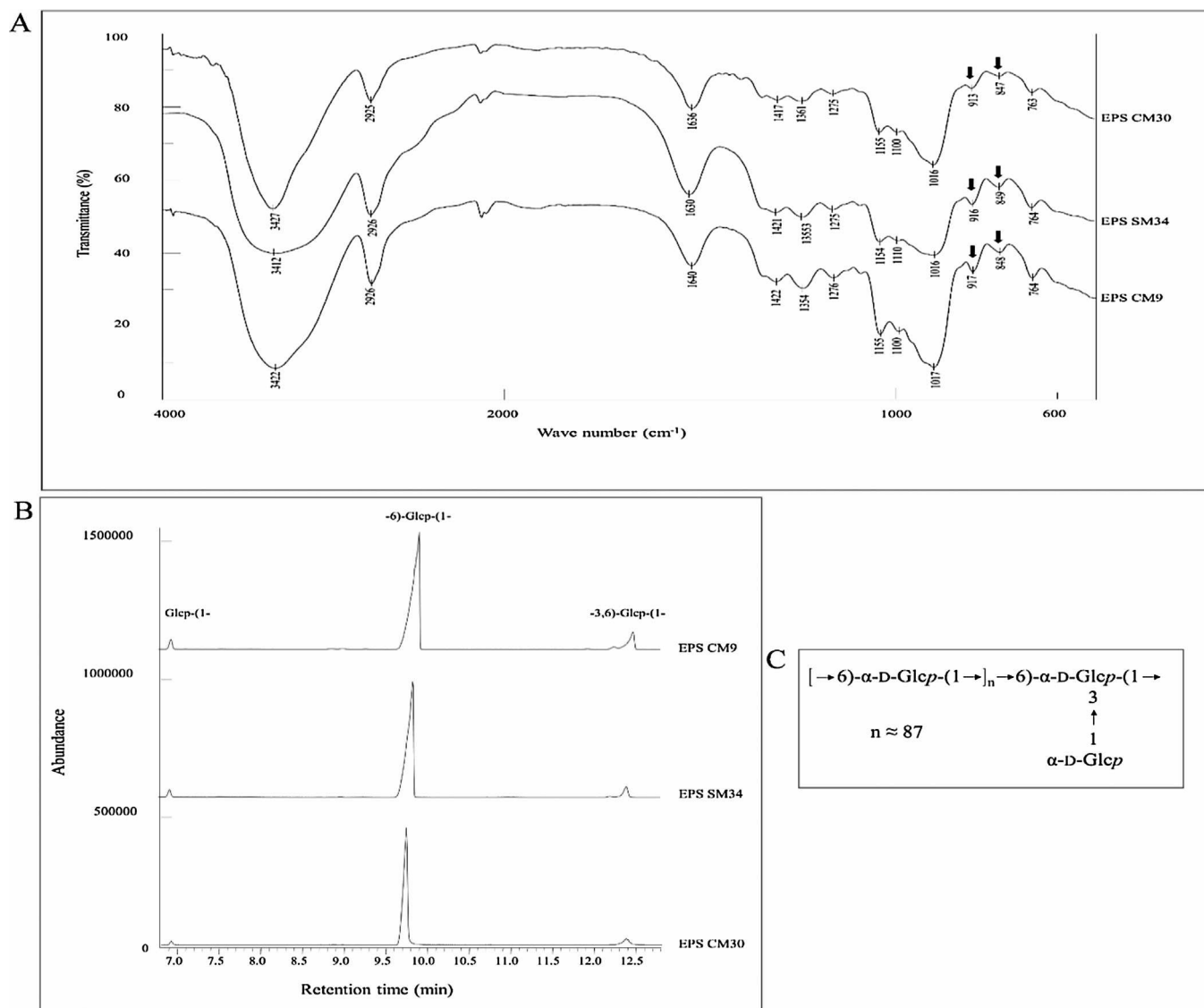


Fig. 1. Physicochemical characterization of dextrans produced by *Lc. mesenteroides* CM30, SM34 and CM9 strains. (A) Infrared spectrum of the three LAB. (B) Types of bonds deduced by the methylation analysis. (C) Structure of the three dextrans.

RTF10, with approximately 6% O-3 substitutions (Nácher-Vázquez et al., 2015; Notararigo et al., 2013) and dextrans produced by other *Lc. mesenteroides* strains (Han et al., 2014; Siddiqui, Aman, Silipo, Qader, & Molinaro, 2014; Werning et al., 2012; Yang et al., 2015).

Previous analysis of the dextran from MN1 and RTF1 by 2D-DOSY revealed that they possess a molecular mass higher than that of the commercial T2000 dextran which has a theoretical molecular mass of 2.0×10^6 Da (Nácher-Vázquez et al., 2015). Thus, to get a more precise estimation of the molecular mass of the five dextrans they were subjected to a SEC-MALLS analysis. The results revealed that they have a high molecular mass within the range of $1-5 \times 10^8$ Da (Table 1 and Fig. 1S).

3.2. Rheological properties of dextran produced by LAB

Aqueous solutions of dextrans from the five LAB were analysed, and the results revealed that the viscosity of the five polymers varied depending on the concentration and the shear rate (Fig. 2). At low concentrations, they showed a shear rate-independent Newtonian viscosity, as already observed for some commercial dextrans (Tirtaatmadja, Dunstan, & Boger, 2001). The upper concentration

limits for this Newtonian or linear plateau were 1.0%, 0.8%, 0.4%, 0.6% and 0.8%, respectively, for the MN1, CM30, SM34, RTF10 and CM9 EPS. At higher concentrations, dextrans show a different behaviour with decreased viscosity when the shear rate was increased. This corresponded to a non-Newtonian or pseudoplastic behaviour and it could be explained by the hydrodynamic forces generated during the shear, which could break structural entanglements and physical networks between α -glucan chains present in the solution.

The rheological experiments also predicted further properties of the dextran molecules by examining the concentration dependence of 'zero shear' specific viscosities. This relationship can demonstrate the presence of interactions between polymer chains by defining the critical concentration (C^*), i.e. the concentration of polymer at which the equivalent sphere of a given polymer molecule just touches the equivalent spheres of all of its nearest neighbour molecules (Kulicke & Clasen, 2013). C^* was calculated by performing a double logarithmic plot of Newtonian viscosity versus the different dextran concentrations. Using the Cross model (see Eq. (1) in Materials and Methods), the Newtonian viscosity (state of rest of zero shear) of the five dextrans was determined by extrapolation.

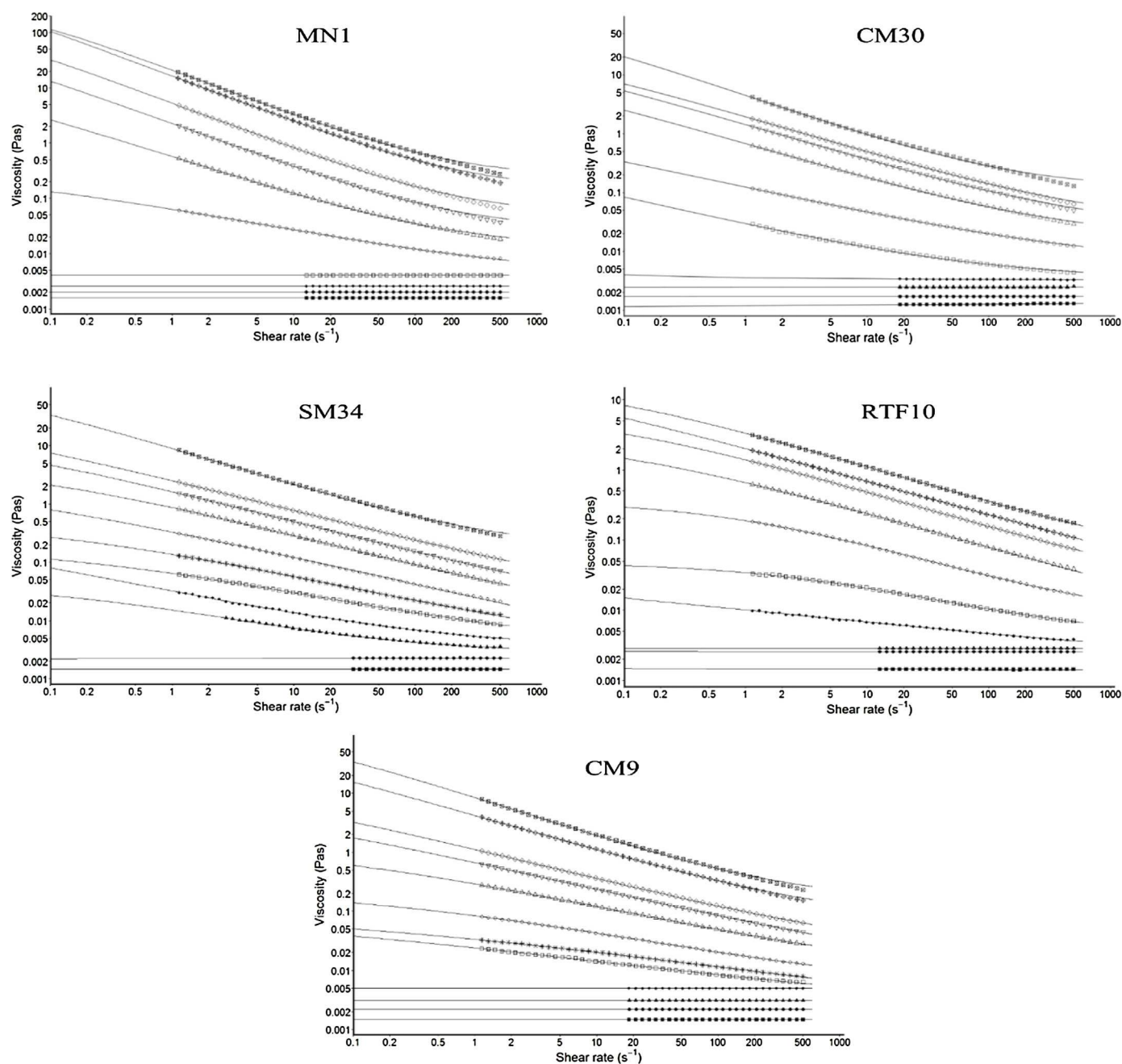


Fig. 2. Apparent viscosity of the LAB dextrans versus the shear rate. The name of the strains from which the dextrans were purified is indicated. The experiments were performed at 20 °C and dextran concentrations used were: 0.2% (■), 0.4% (●), 0.6% (▲), 0.8% (◆), 1% (□), 1.25% (◻), 1.5% (○), 2% (△), 2.5% (▽), 3% (◇), 4% (⊂), 5% (⊞).

olation. Two straight lines were obtained, which corresponded to the diluted and more concentrated domains (Fig. 3).

The results suggested that the Newtonian viscosity increases with dextran concentration, and the critical concentration of the five dextrans varied between 0.5% and 1%. It had been shown, that the critical concentration is inversely proportional to the molecular mass of polysaccharides (Dong et al., 2001; Dong, Wang, & Qing, 2000), which is consistent with most of the dextrans used in this study. For example MN1, a dextran of 1.74×10^8 Da showed a C^* of 1% (Fig. 3A), whereas RTF10 of 4.41×10^8 Da presented a C^* of 0.65% Da (Fig. 3D). Values of slope b between 5.62 and 9.36 were obtained, when the equation 2 (see Eq. (2) in Materials and methods) was applied to the second straight line of each of the five dextrans. Previous works showed that random coil (flexible) polymers have b exponent values in the range of ≥ 5 , and that stiff polymers dis-

played lower values (Bohdanecky & Kovar, 1982; Velasco et al., 2009). Thus, our results revealed that the LAB dextrans under investigation can be considered as random coil with flexible chains.

In addition, the results obtained (Fig. 3F) showed that the viscosity of 3% aqueous solutions (representative viscosity of the concentrated domain) varies between 158 Pas and 13.44 Pas of which dextran MN1 has the highest viscosity and dextran CM9 possesses the lowest viscosity. By comparing these results with the molecular masses of these polymers, it can be inferred that the viscosity is not only influenced by the molecular mass, but by the same parameters determining the critical conductivity of the polymer (cited above) (Glöckner, 2008; Graessley, 1977; Mezger, 2014). No significant variation in viscosity in individual solutions of dextrans was observed with low shear (10 s^{-1}) (data not shown) and strong shear rate (206 s^{-1}) (Fig. 3F).

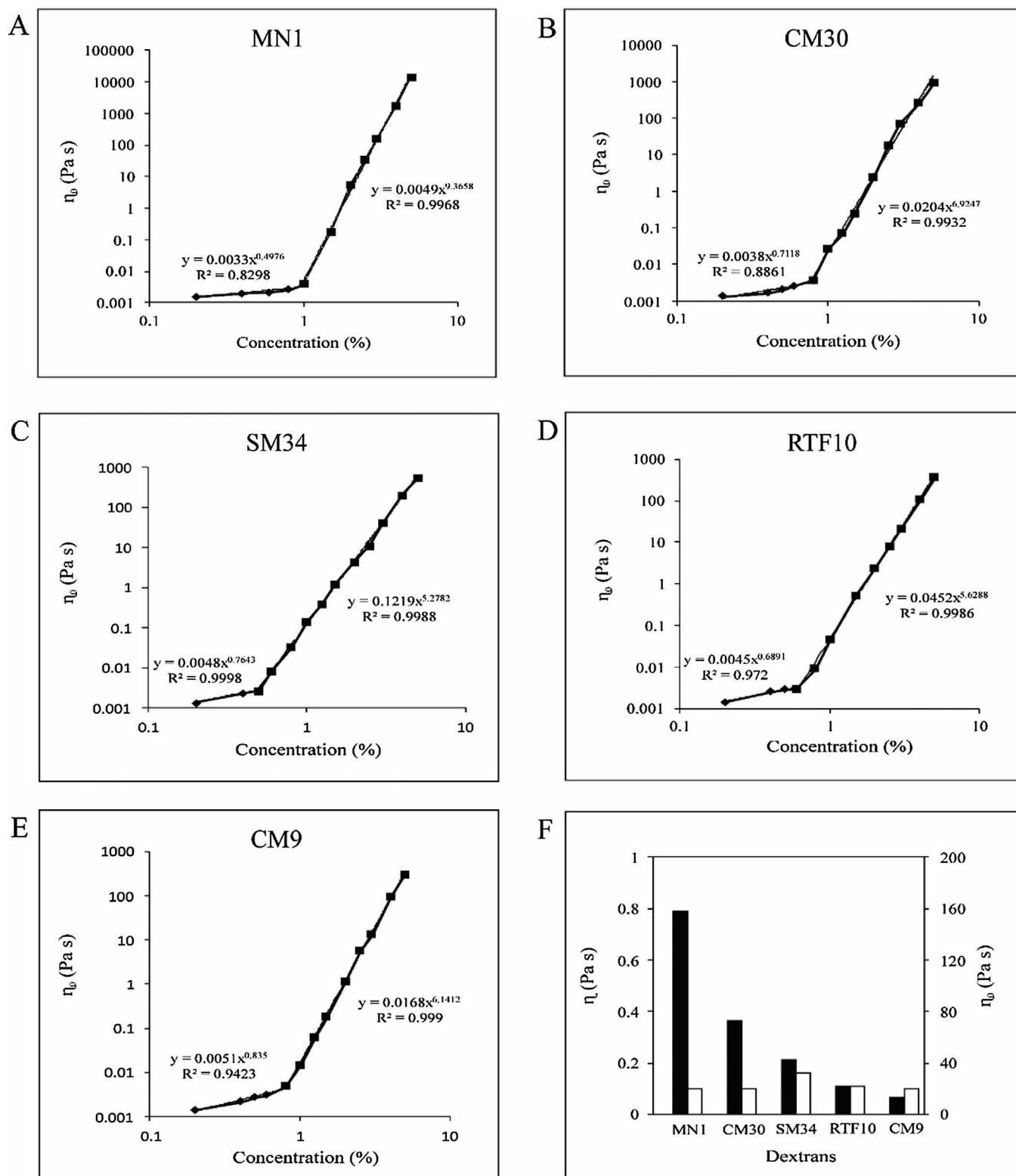


Fig. 3. Influence of dextrans molecular masses in viscosity. Double-logarithmic plot of the Newtonian viscosity versus dextran concentrations (A–E), and (F) viscosity of the aqueous solutions (3% w/v) at zero (η_0 , black) and 206 s^{-1} (η , white) shear rates.

3.3. Immunomodulatory activity of dextrans from LAB

These type of polymers are considered non-toxic compounds (Jean, 2008) and used for medical purposes including, among others, their utilisation as plasma substitutes (reviewed in Pérez-Ramos et al., 2015). Moreover, we have previously shown that

dextran from meat LAB are not toxic for salmonid cell lines and provided *in vivo* results supporting that MN1 dextran stimulates innate and acquired immunity of trout (Nácher-Vázquez et al., 2015). Therefore, the five dextrans from LAB were tested for their potential ability to immunomodulate PMA-THP-1 monocyte-derived macrophages. Influence of these EPS on the secretion of the

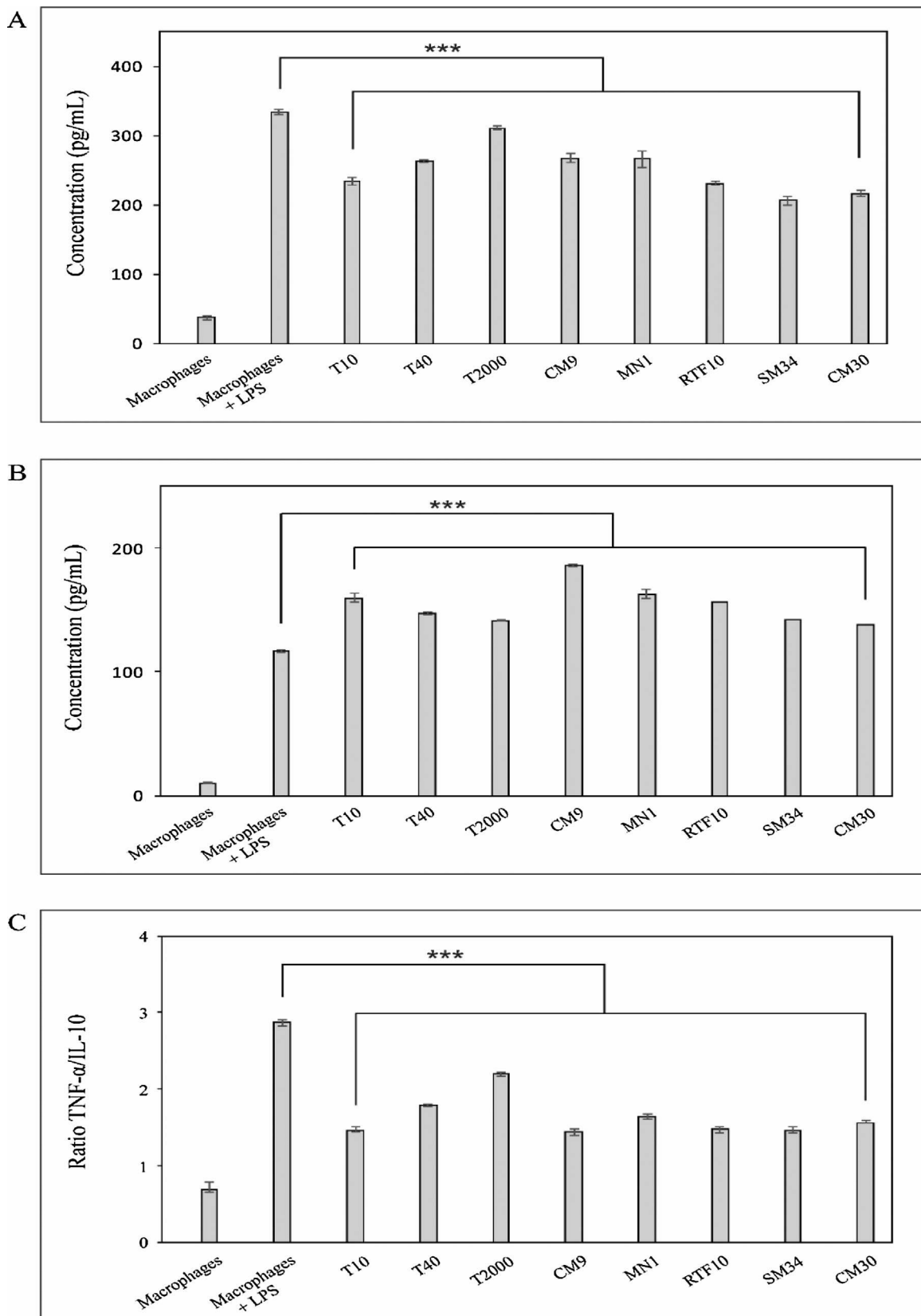


Fig. 4. Influence of dextrans on cytokine production by PMA-THP-1 macrophages stimulated with LPS (*E. coli* O111:B4). (A) TNF- α , (B) IL-10 and (C) ratio TNF- α /IL-10. Dextran produced by *Lb. sakei* MN1 (MN1) and *Lc. mesenteroides* (CM9, CM30, SM34 and RTF10) strains as well as commercial T10, T40 and T2000 dextrans were assayed. Data were analysed using ANOVA. The Dunnett's test was employed to test the statistically significant differences between control and samples. Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

proinflammatory TNF- α and antiinflammatory IL-10 by macrophages stimulated with *E. coli* LPS was investigated (Fig. 4). It has been observed that immunomodulatory activities of EPS synthesised by LAB are based on many parameters such as the physicochemical properties of the polymers and their average molecular mass (Shao et al., 2014). Thus, to test a wider range of polysaccharide molecular masses, the effect of the commercial dextrans T10, T40 and T2000 was also assayed (Fig. 4). These dextrans are produced by a *Leuconostoc* strain, purified and hydrolysed, and like the EPS studied in this work, they had a main chain of glucopyranose units with α -(1,6) linkages and partially branched in the O-3 position. Moreover, analysis of these polymers by SEC-MALLS confirmed the molecular masses of T10 (1.22×10^4 Da) and T40 (3.98×10^4 Da) which are lower than the mass of T2000, which was characterized as 1.33×10^6 Da (results not shown).

Evaluation of the cytokines levels in the PMA-THP-1 cell supernatants showed that the treatment with LPS alone was able to induce the production of both TNF- α and IL10 (Fig. 4A and B).

Moreover, as expected from the inflammatory role of the *E. coli* LPS (Hambleton, Weinstein, Lem, & DeFranco, 1996; Seow et al., 2013) the ratio TNF- α /IL10 increased considerably.

This activation of the macrophages was partially counteracted by co-treatment with all the dextrans tested by decreasing the levels of TNF- α and increasing the levels of IL10, effect that resulted in a significant decrease of the TNF- α /IL10 inflammatory ratio (Fig. 4C).

3.4. Macroscopic and microscopic detection of dextran production

Detection of mucous colonies has been used as a phenotypical test to select EPS-producing bacteria (Patel, Kothari, Shukla, Das, & Goyal, 2011). In addition, we have previously detected production of dextran by the meat LAB in solid medium containing sucrose (Nácher-Vázquez et al., 2017). Thus, the ability of the five LAB to produce EPS was analysed in MRS solid media, containing either sucrose or glucose. Our results revealed that all bacteria presented viscous and mucous colonies, when grown for 48 h on MRSS (Figs. 5A and 2S) but not on MRSG even when incubated for 72 h or longer (Fig. 5C and results not shown). In the presence of sucrose, two types of morphologies were observed, *Lc. mesenteroides* CM9 and *Lb. sakei* MN1 presented convex colonies firmly adhered to the agar with persisting consistent gel gum texture even after 120 h of incubation (Fig. 2S). By contrast, the other three *Lc. mesenteroides* strains showed flat colonies with low adherence to the agar. After 72 h of growth, the colonies appeared surrounded by a semi-liquid gel (Fig. 5B), and they expanded all over the plate at longer incubation times (Fig. 2S). Previous TEM analysis of meat LAB colonies, allowed us to detect the dextran surrounding cells grown in MRSS and not in MRSG (Nácher-Vázquez et al., 2017). Thus, in order to determine the dextran location at cellular level, Algerian LAB colonies were analysed by TEM. The analysis revealed that in all samples of cultures grown in MRSS (Fig. 5D and results not shown), and not in MRSG (Fig. 5D and results not shown), bacteria were surrounded by some molecules, and these had the same appearance as dextran preparations (Fig. 5F and results not shown).

3.5. Analysis of the adhesion ability of LAB

The ability to adhere to enterocytes is a potentially important characteristic to select probiotic strains, and previous results indicated that the adhesion ability of *Lb. sakei* MN1 but not of *Lc. mesenteroides* RTF10 to Caco-2 cells was affected by the presence of dextran (Nácher-Vázquez et al., 2017). Therefore, the influence of dextran synthesis on the binding ability of the milk *Lc. mesenteroides* strains to Caco-2 cells was tested in comparison to that of the meat LAB (Fig. 6).

The results revealed that MN1 and CM9 were able to adhere to the enterocytes with a level of $4.9 \pm 0.43\%$ and $4.12 \pm 0.41\%$, respectively, in the presence of DMEM medium containing glucose. These levels are similar to those (around 5%), which we previously reported for the probiotic *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Fernández de Palencia et al., 2009; Garai-Ibabe et al., 2010; Nácher-Vázquez, 2017).

Moreover, the binding of MN1 and CM9 strains to the Caco-2 cells decreased to $1.09 \pm 0.25\%$ and $2.55 \pm 0.21\%$, respectively, when sucrose was present during bacterial growth in MRSS and during the assay in DMEM medium. By contrast, adhesion of *Lc. mesenteroides* CM30 ($3.52 \pm 0.17\%$), SM34 ($3.68 \pm 0.36\%$) and RTF10 ($0.46 \pm 0.01\%$) strains was not significantly affected by the presence of sucrose in the medium.

4. Discussion

The rheological study performed here revealed that the high molecular weight (ranging from 1.74×10^8 Da to 4.41×10^8 Da) synthesized by LAB isolated from Algerian milk and Spanish fermented meat products have a pseudoplastic behaviour of viscosity. This behaviour has been also observed for other dextrans isolated from bacterial cultures or some commercial hydrolysed dextrans (Kothari, Tingirikari, & Goyal, 2015; McCurdy, Goff, Stanley, & Stone, 1994; Moosavi-Nasab, Alahdad, & Nazemi, 2010) and for others biopolymers, such as xanthan, an anionic HePS produced by Gram-negative bacteria belonging to the genus *Xantomonas* which are used as a food additives and rheology modifiers (Petri, 2015) or immunomodulatory β -glucans synthesised by LAB (Velasco et al., 2009). The pseudoplastic property contributes to better sensory qualities of food and also helps in food processing, when different shear rates may be applied during mixing, pouring and pumping (Moreno et al., 2000). Thus, the dextrans described here are deemed to have potential as food additive.

Differential biological effect of EPS in different ranges of molecular masses has been previously observed (Hidalgo-Cantabrana et al., 2012), since HePS having negative charges and/or small molecular masses were able to act as strong/mild stimulators of immune cells, whereas those EPS with a large size exhibited a weak stimulation. Thus, in the immunomodulation assays of PMA-THP-1 by dextrans performed here, it was expected that the number of polymer molecules decreased upon increase of molecular weight, since the same weight to volume concentration ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) was used for all dextrans. For the commercial dextrans a partial correlation of their effect with the molecular masses was observed, with T2000 producing the lowest and T10 the highest anti-inflammatory effect and resulting, respectively, in the highest and lowest TNF- α /IL10 ratios. However, a high unexpected immunomodulatory effect of the high molecular mass (in the 10^8 power range) EPS produced by our strains was detected. The five dextrans purified and tested in this work had a more pronounced global anti-inflammatory effect (lower TNF- α /IL10 ratio) than T2000, and the four HoPS from *Lc. mesenteroides* strains have a beneficial influence similar to that of T10. Nevertheless, the overall results, and the knowledge of the THP-1 response to pathogens (Murthy, Dennis, Lasater, & Philipp, 2000), indicate that dextrans from *Lb. sakei* MN1 and from *Lc. mesenteroides* strains have the potential to contribute to down-regulate inflammatory and microbicidal mechanisms of the innate immune response against bacterial pathogens.

We have previously shown that dextran production by *Lb. sakei* MN1 but not by *Lc. mesenteroides* RTF10 coincides with reduced autoagglutination, biofilm formation and epithelial cell adhesion (Nácher-Vázquez et al., 2017). Here, the test of the LAB ability to bind to Caco-2 cells revealed two types of bacterial behaviour upon inclusion of sucrose in the assay independent of the genus

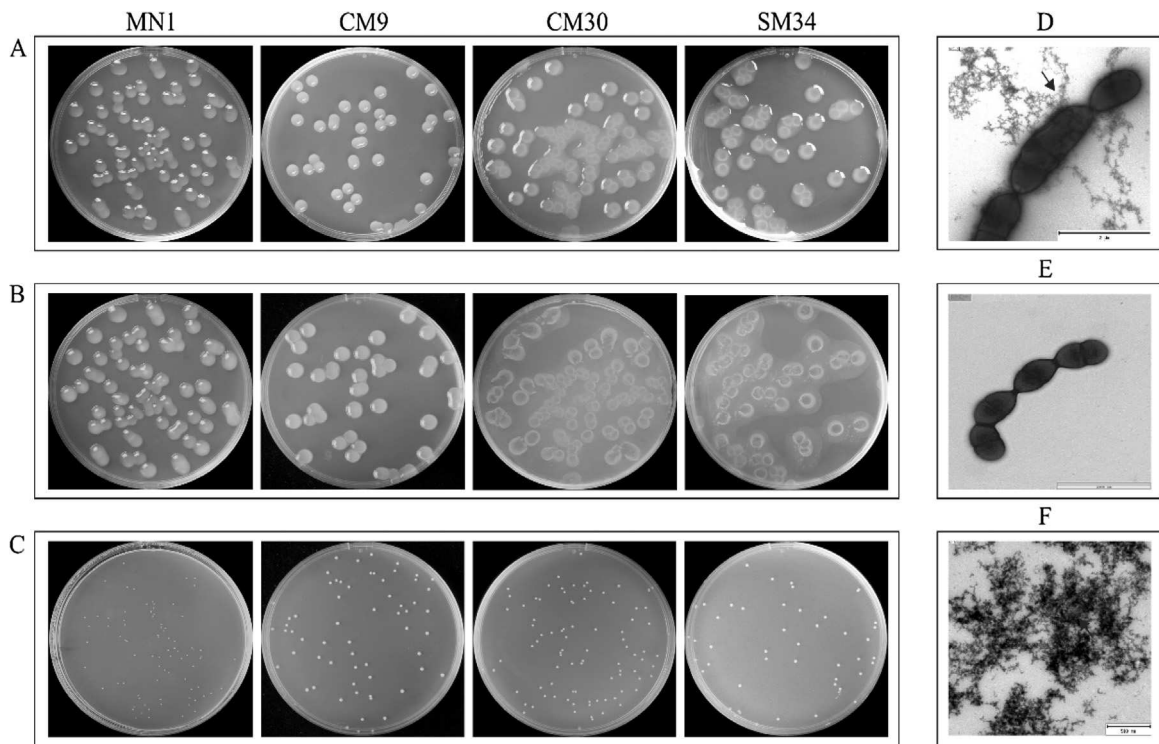


Fig. 5. Detection of EPS production by LAB on solid media. Bacterial colonies in MRSS after 48 h (A) or 72 h (B) incubation, and after 72 h in MRSG (C). Analysis of bacterial colonies of *Lc. mesenteroides* CM9 grown in MRSS (D) or MRSG (E) or its EPS preparation (F) by TEM. Arrows indicate EPS molecules.

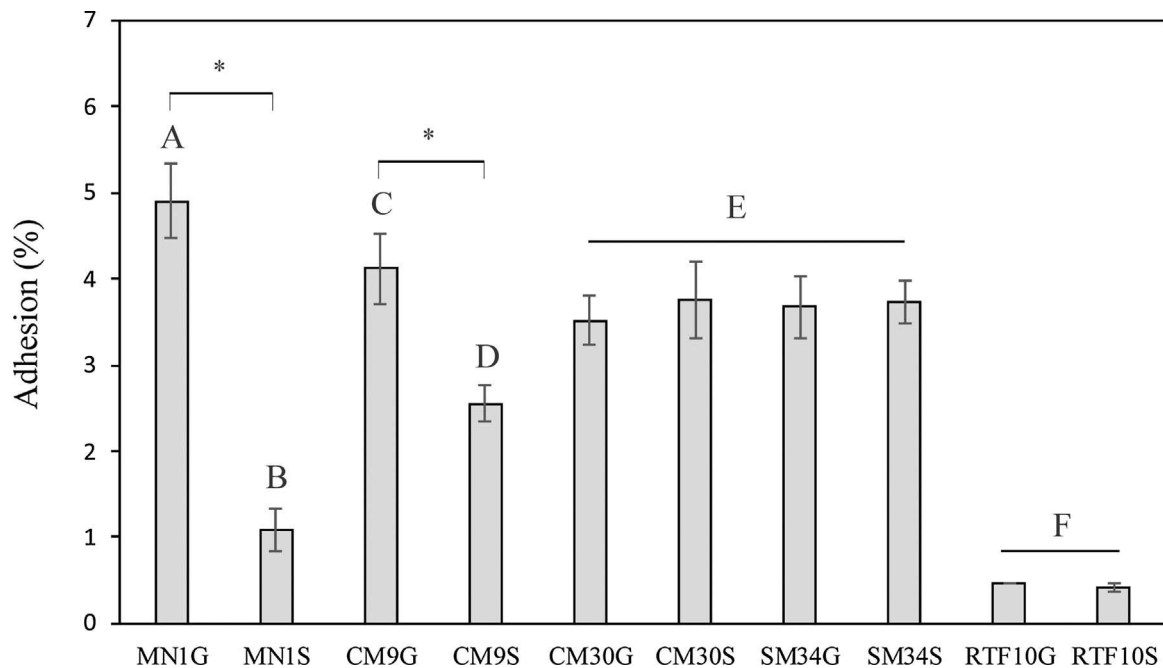


Fig. 6. Adhesion of LAB strains to Caco-2 cells. The assays were performed in DMEM (G) and DMEM supplemented with 0.5% sucrose (S) during 1 h. Adhesion levels of the indicated LAB strains are expressed as the percentage of cfu. 100% corresponds to the number of bacteria added to the Caco-2 cells. Data were analysed by ANOVA. The Tukey's test was employed to test the statistically significant differences between samples. Differences (A-D) were significant with a $*p \leq 0.05$.

or species, and correlating with the two patterns observed for the phenotype of the colonies in the presence of the disaccharide. These differences could be due to variations among the EPS production by different bacteria. However, according to the results presented in Table 1, this does not seem to be the case, because differences in EPS yield, high (1342 and 757) for SM34 and CM30 and medium (452, 396 and 414) for CM9, RTF10 and MN1 did not correlate with the

strains grouping (CM9 and MN1 versus SM34, CM30 and RTF10) for phenotypical and adhesion patterns. Rather, the two phenotypes could be connected to the properties or fate of the dextran. The specific chemical structure and composition of the EPS molecule could affect adhesion. Thus, we have shown that the *O*-2 substituted (1-3)- β -D-glucan HoPS synthesised by *P. parvulus* LAB strains contributes to the attachment to colon epithelial cells (Fernández de

Palencia et al., 2009; Garai-Ibabe et al., 2010). However, this is not a general feature for EPS from LAB, since it has been shown in *Lactobacilli* that their adhesion to enterocytes increased, when various EPS (i.e. rich in either galactose or rhamnose or HePS) production was abolished (Horn et al., 2013; Lebeer et al., 2009). In agreement, our results showed that in the presence of dextran synthesis adhesion decreased or it was not affected. In addition, the phenotype observed for CM30, RTF10 and SM34 colonies could be related to synthesis or generation of low molecular weight EPS ($<10^4$ D), lost during purification. In this line, it is feasible that these bacteria could be able to synthesise dextranses, since some *Lc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* strains possess this enzymatic activity (Mahmoud et al., 2014), which has not been yet ascribed to any sequenced gene. Consequently, if this is the case these LAB could not only synthesise dextran, but also degrade it later to use it not only as a carbon source, when required, but also to expand its niche by planktonic growth. This hypothesis deserves to be subjected to further investigation in the future.

5. Conclusions

Results of the present study expand our knowledge on LAB EPS production and its biological role. Regarding the molecular mass of LAB dextrans, a fine determination was obtained by the use of SEC-MALLS, which led to disclose that high EPS mass correlate with a pattern of immunomodulation. The physicochemical and rheological studies showed that LAB EPS analysed here have a low percentage of branching and a flexible configuration that can be at least partially responsible for their beneficial behaviour in immunomodulation assays.

In addition, our results indicate that dextran-production does not have a beneficial effect on initial interaction with enterocytes, but it can contribute to the further colonisation of the ecological niche.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (grant AGL2015-65010-C3-1-R). We thank Dr. Stephen W. Elson for critical reading of the manuscript. We thank Dr. Guillermo Padilla Alonso for his valuable assistance in the biostatistical analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.113>.

References

- Aman, A., Siddiqui, N. N., & Qader, S. A. U. (2012). Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 910–915. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.094>
- Bounaix, M. S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Simeon, M., et al. (2009). Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57(22), 10889–10897. <http://dx.doi.org/10.1021/jf920668t>
- Chanput, W., Mes, J., Vreeburg, R. A., Savelkoul, H. F., & Wichers, H. J. (2010). Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food & Function*, 1(3), 254–261. <http://dx.doi.org/10.1039/c0fo00113a>
- Chenoll, E., Macian, M. C., Elizaquivel, P., & Aznar, R. (2007). Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: Population analysis by rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 498–508. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03081.x>
- Ciszek-Lenda, M. (2011). Biological functions of exopolysaccharides from probiotic bacteria. *Central European Journal of Immunology*, 36(1), 51–55.
- Cross, M. M. (1965). Rheology of non-Newtonian fluids: A new flow equation for pseudoplastic systems. *Journal of Colloid Science*, 20(5), 417–437. [http://dx.doi.org/10.1016/0095-8522\(65\)90022-X](http://dx.doi.org/10.1016/0095-8522(65)90022-X)
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
- Dong, Y. M., Wang, J. W., & Qing, Y. (2000). Influence of molecular weight of chitin and its three derivatives on critical concentration of lyotropic liquid crystalline phase transition. *Chinese Journal of Polymer Science*, 18(1), 15–17.
- Dong, Y., Qiu, W., Ruan, Y., Wu, Y., Wang, M., & Xu, C. (2001). Influence of molecular weight on critical concentration of chitosan/formic acid liquid crystalline solution. *Polymer Journal*, 33(5), 387–389. <http://dx.doi.org/10.1295/polymj.33.387>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Fernández de Palencia, P., Werning, M. L., Sierra-Filardi, E., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Corbí, A. L., et al. (2009). Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)-β-D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14), 4887–4891. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00394-09>
- Garai-Ibabe, G., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Sierra-Filardi, E., Werning, M. L., López, P., et al. (2010). Naturally occurring 2-substituted (1,3)-β-D-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the production of functional foods. *Bioresource Technology*, 101(23), 9254–9263. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.050>
- Gaspar, P., Carvalho, A. L., Vinga, S., Santos, H., & Neves, A. R. (2013). From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 31(6), 764–788. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.03.011>
- Glöckner, P. (2008). Radiation curing: Coatings and printing inks. In *Technical basics applications and trouble shooting*. Vincentz Network.
- Graessley, W. W. (1977). Effect of long branches on the flow properties of polymers. *Accounts of Chemical Research*, 10(9), 332–339. <http://dx.doi.org/10.1021/ar50117a004>
- Hambleton, J., Weinstein, S. L., Lem, L., & DeFranco, A. L. (1996). Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 93(7), 2774–2778.
- Han, J., Hang, F., Guo, B., Liu, Z., You, C., & Wu, Z. (2014). Dextran synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in tomato juice supplemented with sucrose. *Carbohydrate Polymers*, 112, 556–562. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.035>
- Harutoshi, T. (2013). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications. *Biochemistry, genetics and molecular biology*. In J. Marcelino Kongo (Ed.), *Lactic acid bacteria: R and D for food, health and livestock purposes* (pp. 222–238). InTech.
- Hidalgo-Cantabrana, C., López, P., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., Suárez, A., Margolles, A., et al. (2012). Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), 227–237. <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-012-9110-2>
- Horn, N., Wegmann, U., Dertli, E., Mulholland, F., Collins, S. R. A., Waldron, K. W., et al. (2013). Spontaneous mutation reveals influence of exopolysaccharide on *Lactobacillus johnsonii* surface characteristics. *PLoS One*, 8(3), e59957. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059957>
- Jean, B. (2008). *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants (2e ed. – retirage broch)*. Lavoisier.
- Kothari, D., Tingirikari, J. M. R., & Goyal, A. (2015). In vitro analysis of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 for functional food application. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 6(2), 55–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2015.08.001>
- Kulicke, W. M., & Clasen, C. (2013). *Viscosimetry of polymers and polyelectrolytes*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrene, Y., et al. (2009). Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Applied Environmental Microbiology*, 75(11), 3554–3563. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02919-08>
- Maeyama, R., Mizunoe, Y., Anderson, J. M., Tanaka, M., & Matsuda, T. (2004). Confocal imaging of biofilm formation process using fluoroprobed *Escherichia coli* and fluoro-stained exopolysaccharide. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 70(2), 274–282. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30077>
- Mahmoud, K. F., Gibril, A. Y., Amin, A. A., Nessrien, M. N., Yassien, N. M., & El Banna, H. A. (2014). Production and characterization of dextranses. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 3(9), 1095–1113.
- Mayeux, J. V., Sandine, W. E., & Elliker, P. R. (1962). A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 45, 655–656.
- McCurdy, R. D., Goff, H. D., Stanley, D. W., & Stone, A. P. (1994). Rheological properties of dextran related to food applications. *Food Hydrocolloids*, 8(6), 609–623. [http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80068-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80068-4)
- Mezger, T. G. (2014). *The rheology handbook: For users of rotational and oscillatory rheometers*. Vincentz Network.
- Monterisino, S., Prieto, A., Muñoz, R., & Rivas, B. D. L. (2008). Evaluation of exopolysaccharide production by *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated

- from wine. *Journal of Food Science*, 73(4), M196–M199. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00726.x>
- Moosavi-Nasab, M., Alahdad, Z., & Nazemi, S. H. (2010). Characterization of the dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* from date fruit extract. *Iran Agricultural Research*, 27.28(1.2), 79–88.
- Moreno, J., Vargas, M. A., Madiedo, J. M., Muñoz, J., Rivas, J., & Guerrero, M. G. (2000). Chemical and rheological properties of an extracellular polysaccharide produced by the *Cyanobacterium Anabaena* sp. ATCC 33047. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(3), 283–290. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000205\)67:3<283::AID-BIT4>3.0.CO;2-H](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000205)67:3<283::AID-BIT4>3.0.CO;2-H)
- Mozzi, F., Raya, R. R., & Vignolo, G. M. (2015). *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. Wiley.
- Murthy, P. K., Dennis, V. A., Lasater, B. L., & Philipp, M. T. (2000). Interleukin-10 modulates proinflammatory cytokines in the human monocytic cell line THP-1 stimulated with *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *Infection and Immunity*, 68(12), 6663–6669.
- Nácher-Vázquez, M., Ballesteros, N., Canales, A., Rodriguez Saint-Jean, S., Pérez-Prieto, S. I., Prieto, A., et al. (2015). Dextrans produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses. *Carbohydrate Polymers*, 124, 292–301. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.020>
- Nácher-Vázquez, M., Iturría, I., Zarour, K., Mohedano, M. L., Aznar, R., Pardo, M. A., et al. (2017). Dextran production by *Lactobacillus sakei* MN1 coincides with reduced autoagglutination, biofilm formation and epithelial cell adhesion. *Carbohydrate Polymers*, 168, 22–31.
- Nikolic, M., López, P., Strahinic, I., Suarez, A., Kojic, M., Fernández-García, M., et al. (2012). Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 158(2), 155–162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.015>
- Notararigo, S., Nácher-Vázquez, M., Ibarburu, I., Werning, M. L., Fernández de Palencia, P., Dueñas, M. T., et al. (2013). Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 57–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.016>
- Nuraida, L. (2015). A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Science and Human Wellness*, 4(2), 47–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2015.06.001>
- Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14002–14015. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms131114002>
- Pérez-Ramos, A., Nácher-Vázquez, M., Notararigo, S., López, P., & Mohedano, M. L. (2015). Current and future applications of bacterial extracellular polysaccharides. In V. R. P. A. R. R. Watson (Ed.), *Probiotics, prebiotics, and synbiotics*. UK: Elsevier Oxford Ed.
- Park, J. H., Ahn, H. J., Kim, S. G., & Chung, C. H. (2013). Dextran-like exopolysaccharide-producing *Leuconostoc* and *Weissella* from kimchi and its ingredients. *Food Science and Biotechnology*, 22(4), 1047–1053. <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-013-0182-x>
- Patel, S., Kothari, D., Shukla, R., Das, D., & Goyal, A. (2011). Scale up of dextran production from a mutant of *Pediococcus pentosaceus* (SPAm) using optimized medium in a bioreactor. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, 1125–1134.
- Patel, S., Majumder, A., & Goyal, A. (2012). Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 52(1), 3–12. <http://dx.doi.org/10.1007/s12088-011-0148-8>
- Petri, D. F. S. (2015). Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(23) <http://dx.doi.org/10.1002/app.42035>
- Piret, J., Lamontagne, J., Bestman-Smith, J., Roy, S., Gourde, P., Désormeaux, A., et al. (2000). In vitro and in vivo evaluations of sodium lauryl sulphate and dextran sulphate as microbicides against herpes simplex and human immunodeficiency viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 110–119.
- Sánchez, C., Neves, A. R., Cavalheiro, J., dos Santos, M. M., García-Quintás, N., López, P., et al. (2008). Contribution of citrate metabolism to the growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at low pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1136–1144. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01061-07>
- Sanlibaba, P., & Çakmak, A. G. (2016). Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology: Open Access*, 2(2) <http://dx.doi.org/10.4172/2471-9315.1000115>
- Sarwat, F., Ahmed, N., Aman, A., & Qader, S. A. (2013). Optimization of growth conditions for the isolation of dextran producing *Leuconostoc* spp. from indigenous food sources. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(4), 793–797.
- Seow, V., Lim, J., Iyer, A., Suen, J. Y., Ariffin, J. K., Hohenhaus, D. M., et al. (2013). Inflammatory responses induced by lipopolysaccharide are amplified in primary human monocytes but suppressed in macrophages by complement protein C5a. *Journal of Immunology*, 191(8), 4308–4316. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1301355>
- Shao, L., Wu, Z., Zhang, H., Chen, W., Ai, L., & Guo, B. (2014). Partial characterization and immunostimulatory activity of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* KF5. *Carbohydrate Polymers*, 107, 51–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.037>
- Siddiqui, N. N., Aman, A., Silipo, A., Qader, S. A. U., & Molinaro, A. (2014). Structural analysis and characterization of dextran produced by wild and mutant strains of *Leuconostoc mesenteroides*. *Carbohydrate Polymers*, 99, 331–338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.004>
- Surayot, U., Wang, J., Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Tabarsa, M., Lee, Y., et al. (2014). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: structural analysis, molecular weight effect on immunomodulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 233–240.
- Tirtaatmadja, V., Dunstan, D. E., & Boger, D. V. (2001). Rheology of dextran solutions. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 97(2–3), 295–301. [http://dx.doi.org/10.1016/S0377-0257\(00\)00226-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0377-0257(00)00226-3)
- Velasco, S. E., Areizaga, J., Irastorza, A., Dueñas, M. T., Santamaria, A., & Muñoz, M. E. (2009). Chemical and rheological properties of the β -glucan produced by *Pediococcus parvulus* 2.6. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 57(5), 1827–1834. <http://dx.doi.org/10.1021/jf803065w>
- Vettori, M. H. P. B., Blanco, K. C., Cortez, M., de Lima, C. J. B., & Contiero, J. (2012). Dextran: Effect of process parameters on production, purification and molecular weight and recent applications. *Diálogos & Ciência*, 31, 171–186. <http://dx.doi.org/10.7447/dc.2012.018>
- Vettori, M. H. P. B., Franchetti, S. M. M., & Contiero, J. (2012). Structural characterization of a new dextran with a low degree of branching produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B dextranucrase. *Carbohydrate Polymers*, 88(4), 1440–1444. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.048>
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535–2554. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14072535>
- Welman, A. D., & Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6), 269–274. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00107-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00107-0)
- Werning, M. L., Notararigo, S., Nácher, M., Fernández de Palencia, P., Aznar, R., & López, P. (2012). Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In Y. El-Samragy (Ed.), *Food additives* (pp. 83–114). Croatia: Intech.
- Yang, Y., Peng, Q., Guo, Y., Han, Y., Xiao, H., & Zhou, Z. (2015). Isolation and characterization of dextran produced by *Leuconostoc citreum* NM105 from manchurian sauerkraut. *Carbohydrate Polymers*, 133, 365–372. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.061>

Full Length Research Paper

Bioprospecting of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from Algerian raw camel and goat milk for technological properties useful as adjunct starters

Zarour K.¹, Benmechernene Z.¹, Hadadji M.¹, Moussa-Boudjema B.², Henni D. J.¹ and Kihal M.^{1*}

¹Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Oran University, B.P.16, Es-Senia, Oran 31100, Algeria.

²Laboratory of Microbiology and Food Safety, Department of Biology, University Aboubekr Belkaid, Tlemcen.13000. Algeria.

Accepted 9 February, 2012

***Leuconostoc* species are lactic acid bacteria widely used in milk fermentation. Based on morphological, physiological and biochemical analysis, 18 strains of *Leuconostoc mesenteroides* were isolated and identified from 10 samples of goat's milk and camel's milk. Strains were identified as follows 09 strains of *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and 09 strains of *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*. The results of technological tests of the strains showed that strains produced dextran, carbon dioxide, and resist to 55°C for 15 min, which promote their industrial use. The growth kinetic, acidification evolution and carbon dioxide production of *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* strain in skim milk at 30°C were slightly higher than *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Addition of yeast extract to skim milk stimulates the development of *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* by increasing its growth, acidification activity and evolved CO₂. Susceptibility to antibiotics was also evaluated on 33 antibiotics and strains of *L. mesenteroides* showed resistance to 42.4% of antibiotics used.**

Key words: Technological, *Leuconostoc*, milk, growth kinetic, carbon dioxide, yeast extract, antibiotics.

INTRODUCTION

Lactic acid bacteria are a heterogeneous group of microorganisms that produce lactic acid as the main product of metabolism (Carr et al., 2002). They colonize many food products such as dairy products, meat, vegetables and cereals; they are part of the intestinal and vaginal flora (Dortu et al., 2009; Mayo et al., 2010). *Leuconostoc* species are widely used as starter cultures and play an important role in food preservation, microbiological stability and production of aroma compounds in various food products. Indeed, lactic acid bacteria produce many metabolites with antimicrobial properties such as organic acids, carbon dioxide and

diacetyl. They play an important role in hygiene by lowering the pH and excreting a variety of inhibitory compounds that inhibit the development of undesirable bacteria (Hugenholtz et al., 2002; Guessas et al., 2005; Dortu et al., 2009). Lactic acid bacteria are Gram-positive, catalase-negative, immobile and non-sporulating; they grow in anaerobic conditions but they can be aerotolerant (Mayo et al., 2010).

Currently, the lactic acid bacteria include thirteen different bacterial genera: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* and *Vagococcus* (Dortu et al., 2009).

Among the lactic acid bacteria commonly used in dairy industry, heterofermentative bacteria of the genus

*Corresponding author. E-mail: Kihalm@gmail.com.



Science For A Better Life



más salud, más vida



Abstracts are available online only, free of charge, at
www.karger.com/doi/10.1159/000478672

International Symposium on Immunonutrition 2017

Madrid, 17th–19th July, 2017

10th Anniversary

Abstracts

Guest Editor
A. Marcos, Madrid

Contents

- 32 Introduction to the International Symposium on Immunonutrition 2017
- 33 Abstract Lectures
- 48 Free Abstracts
- 78 Author Index

KARGER Basel · Freiburg · Paris · London · New York · Chennai · New Delhi ·
Bangkok · Beijing · Shanghai · Tokyo · Kuala Lumpur · Singapore · Sydney

Characterization of Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacteria of Technological Interest

Kenza Zarour¹, M^a Goretti Llamas², M^a Teresa Dueñas³, Rosa Aznar⁴, Mebrouk Kihal⁵, Paloma López⁶

¹Microbiologist, Center for Biological Reserach, CIB, CSIC, Madrid, Spain; ²Biotechnologist, University of the Basque Country, San Sebastián, Spain, CIB-CSIC, Madrid, Spain; ³Biologist, University of the Basque Country, San Sebastián, Spain; ⁴Biotechlogist, Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA-CSIC), Valencia, Spain; ⁵University of Oran 1 Ahmed Ben Bella, Oran, Algeria; ⁶Biologist, Center for Biological Research CIB-CSIC, Madrid, Spain

Objective: The characterization of lactic acid bacteria (LAB), belonging to *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus sakei* species isolated from different ecosystems, and of their exopolysaccharides (EPS) produced in the presence of sucrose as carbon source.

Key Findings: LAB isolated from food products (camel and sheep milks, meat products and cider) were selected according to the level of production of EPS in both liquid as solid media. EPS were produced in the presence of sucrose, purified from bacterial culture supernatants by ethanol precipitation, dialyzed and lyophilized [1]. Methylation analysis and determination of monomer composition revealed that the EPS are homopolysaccharides (dextrans) with a main chain of glucopyranose units linked by α -(1,6) bonds, and partially branched in the O-3 position by a single α -glucopyranose unit [2]. The determination of the rheological properties of the dextrans showed that dextrans, under shear conditions, have a pseudoplastic behavior linked to a flexible chain influenced by the polymer concentrations. Size exclusion chromatography coupled with multiangle laser light scattering (SEC-MALLS) detection analysis [3] demonstrated that the dextrans had molecular masses between 1.74x10⁸ Da and 4.41x10⁸ Da. In addition, these dextrans clearly showed in vitro anti-inflammatory immunomodulatory activity in the THP-1 cell line. The ability of the dextran-producing LAB for binding to Caco-2 cells was strain dependent and in some cases negatively affected by the production of dextran as previously observed [4].

Conclusion: The LAB and theirs dextrans showed probiotic and technological properties that qualified them to be used in the agri-food for industry producing functional foods.

Acknowledgments: We thank Dr. Alicia Prieto for her appreciated contribution in physico-chemical analysis of EPS and Dr. Patricia Ruas-Madiedo for her valuable assistance in EPS molecular mass determination.

Financial Support: This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [grants AGL2012-40084C03-01 and AGL2015-65010-C3-1-R].

Authorship: K. Zarour: Isolation, technological characterization of *Leuconostoc* strains from algerian milks and their exopolysaccharides. M.G. Llamas: Isolation, technological characterization of *Leuconostoc* and *Lactobacillus* strains from meat products and cider and their exopolysaccharides. R. Aznar provided the strains isolated from meat products and carried out a critical reading of the paper. M.T. Dueñas: contribution in interpretation of

rheological analysis data of polymers produced by LAB. M. Kihal: contribution in isolation and phenotypic identification of *Leuconostoc* strains from Algerian food products. P. López: research direction and interpretation of the analytical data.

Keywords: Lactic acid bacteria, exopolysaccharides, dextrans, adhesion, immunomodulation.

References

- 1 Notararigo S, Nacher-Vazquez M, Ibarburu I, Werning ML, de Palencia PF, Dueñas MT, et al: Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers* 2013;93(1):57–64.
- 2 Nacher-Vázquez M, Ballesteros N, Canales A, Rodríguez Saint-Jean S, Perez-Prieto SI, Prieto A, et al: Dextrans produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses. *Carbohydrate Polymers* 2015;124:292–301.
- 3 Nikolic M, Lopez P, Strahinic I, Suarez A, Kojic M, Fernandez-Garcia M, et al: Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *International Journal Food of Microbiology* 2012;158(2):155–162.
- 4 Nacher-Vázquez M, Iturria I, Zarour K, Mohedano ML, Aznar R, Pardo MÁ, et al: Dextran production by *Lactobacillus sakei* MN1 coincides with reduced autoagglutination, biofilm formation and epithelial cell adhesion. *Carbohydrate Polymers* 2017;168:22–31.

259/14

Seeking a Model for Immunonutrition: Exhausting Exercise in Rats

Sheila Estruel-Amades¹, Ignasi Azagra¹, Mar Abril-Gil¹, Àngels Franch¹, Francisco José Pérez-Cano², Margarida Castell¹

¹Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ²Section of Physiology, Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Nutrition and Food Safety Research Institute (INSA-UB), 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain

Although a regular and moderate physical activity enhances body defences (Kruijzen-Jaarsma et al., 2013), the immune system is negatively impacted by exhausting exercise, conducting an increasing risk of opportunistic infections (Gleeson, 2007). This condition is therefore a challenge for immunonutrition, looking for appropriate diets that prevent, delay or inhibit the deficiencies in the immunity. Animal models in which an exercise-derived immunodepression could be reproduced are very limited. The aim of this study was to establish immune markers of exhausting exercise both in the systemic and mucosal lymphoid tissues of rats reflecting the depression of the immune function.

Young Wistar rats were trained in a treadmill for 4 weeks and, at the end, they were submitted to an exhaustion protocol in the same treadmill. Blood and faeces were collected throughout the study. Macrophages were isolated from peritoneal cavity and small intestine was dissected. In addition, the weight of gastrocnemius muscle, heart and lymphoid tissues were registered.

Evaluation of Microbiological Quality of the Date Fruit Product “*Btana*” Produced in Adrar South Algeria

Abekhti A.^{1,2,*}, Zarour K.², Boulal A.², Benmecherne Z.², Kihal M.¹

¹Department of Nature and life science, Univesity of Biskra, B.P. 145, R.P., 07000, Biskra, Algeria

²Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Oran University, BP 16, Es-senia, 31100, Oran, Algeria

Abstract Dates, the fruits of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) are a vital element of the daily diet in the Arabian world. Dates over production needs to be transformed into local traditional products like “*Btana*”. Our study aimed to describe the dynamic changes of microbial and chemical parameters (pH, water content) of dates during transformation and storage period. Samples were collected from different processing and storage periods from 4 villages in Adrar province located at the south of Algeria. Microbial analysis showed that Lamaize raw dates recorded a high number of APc count (3.5×10^2 ufc/g). In addition Abani samples included a level of faecal coliforms (40 ufc/g) which were absent in other samples. API 20 E assay confirm the presence of *Klebsiella* (*K. terrigena*, *K. pneumonia* and *K. oxytoca*) and *Yersinia enterocolica*. At the end of the storage period, an important decrease in microbial population was recorded. The highest reduction of APc was observed in Mraguen sample (from $3,5 \times 10^6$ to 5×10^2 ufc/g) during four weeks of storage. Fungal population significantly diminished at the fourth week of storage. Both pathogens and bacterial indicators detected on raw dates (*S. aureus*, faecal coliforms) were completely absent in the stored *Btana*.

Keywords Date Fruit, Storage, Microflora, Quality, Indicator, Date Palm, *Btana*

1. Introduction

Dates, the fruits of date palm (*Phoenix dactylifera*) are an important stable food in the diet of population living in the arid and semi-arid regions of North Africa, Middle East and South-Asian countries[1, 2]. Dates have a nutritional value contributing significantly to improve the diet of consumers, for that it is consumed widely and practically during the holy month of Ramadan, popular festivities, funerals and to welcome guests. This fruit is found to contain carbohydrates (44-88%), fats (0.2-0.4%), fiber (6.4-11.5%), minerals, vitamins and an interestingly higher concentration of protein (2.3-5.6%) compared with other major cultivated fruits such as apples, oranges, bananas and grapes that contain only 0.3%, 0.7%, 1.0% and 1.0% of protein respectively[3].

So far, other investigations showed that date fruit contain many bioactive compounds like anthocyanins, carotenoids, phenolics, sterols, procyanidins and flavonoids, which are thought to have a beneficial effects on human health[4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14,11, 15].

In Algeria, south regions count 18.7 million palm trees scattered over 169361 ha which produce almost 690,000

metric tons[16, 17]. However, 30% of the production of Algerian dates is characterized by a low commercial quality known as common cultivars[18, 19]. The local population has developed many kinds of date by-products like vinegar, flour, syrup, and juice to overcome post-production lost of the common cultivars not commercialized. *Btana* is a very popular traditional date's preservation methods which include the transformation of raw dates to paste, according to the local knowledge. After transformation, dates could be preserved up to two years in some regions.

Recently, a prevailing trend is being stated to more natural and traditional products in consumer's hobbies and local foods have gained more importance. Several studies were carried out to describe the mode of preparation of these foods[20, 21, 22]. Some authors shift the emphasis on the safety of these foods, the microbial dynamic lengthwise their preparation, storage period as well as the impact on the food quality[23, 24, 25, 26, 27].

However, there are a few previous studies concerning microbial quality of dates and their by-products[1, 28]. So far, hitherto no previous microbial study was consecrated to *Btana* and its indigenous microflora. The objective of the present study is to screen the microbial quality of *Btana*, and identify the dominant microflora during its preparation and storage. pH and water content survey were also performed during *Btana* preparation as they imply *Btana* quality.

2. Materials and Methods

* Corresponding author:
abekhti2008@yahoo.com (Abekhti A.)

Published online at <http://journal.sapub.org/microbiology>

Copyright © 2013 Scientific & Academic Publishing. All Rights Reserved

Physico-chemical and Microbiological Analysis of Algerian Raw Camel's Milk and Identification of Predominating Thermophilic Lactic Acid Bacteria

Merzouk Yamina, Chahrour Wassila, Zarour Kenza, Zergui Amina, Saidi Noureddine, Henni Jamal Eddine and Kihal Mebrouk

Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Oran University, Oran 31100, Algeria

Received: November 26, 2012 / Published: February 20, 2013.

Abstract: The dromedary camel (*Camelus dromedarius*) is a significant socioeconomic importance in several arid and semi-arid regions of North Africa and Middle East, and its milk constitutes an important component of human diets in these regions. The camel milk plays a vital role in the food of the Algerian nomads in the Sahara. During February and September, 20 samples of the raw camel's milk were taken starting from different livestock of camels from three different Sahariennes regions (Bechar, El-Bayadh and Naama). These 20 collected samples were analyzed by physico-chemical and microbiological methods. The results of physicochemical analyze obtained from two hot and cold seasons are respectively the following: T °C (35.83 and 33.95), pH (6.36 and 6.49), density (1.031 and 1.032), dornic acidity (18.6 and 18.3 °D), dry matter (93.4 and 144.8 g/L), fat contents (30 and 52.1 g/L), total protein (26.3 and 33.1 g/L) and ashes (7.46 and 8.66 g/L). The protein profile obtained by electrophoretic analysis (SDS-PAGE) showed that camel milk contains several types of proteins and some have a molecular weight identical to major proteins of the cow's milk. The final results showed that camel milk has generally a comparable composition to that of bovine milk. The microbiological analysis, of these samples, detected a significant number of the total microflora, *Staphylococcus aureus* and total coliforms. The absence of *Clostridium* and fecal coliforms was observed. Several species of lactic acid bacteria were detected such as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Weissella cibaria* and *Enterococcus faecalis*.

Key words: Raw camel's milk, physicochemical analysis, microflora, electrophoretic analysis, proteins of milk.

1. Introduction

According to Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) statistics, there are about 19 million camels in the world, of which 15 million are found in Africa and 4 million in Asia. Of this estimated population, 17 million are considered to be a single hump camels (*Camelus dromedarius*) and 2 million with two-humped (*Camelus bactrianus*). Approximately 15 million dromedaries, representing two-thirds of the world camel population, are living in the arid areas of Africa, particularly in Northeast Africa (Somalia, Sudan, Ethiopia, and Kenya) [1-3]. In

Algeria, according to the statistics of FAO [4], the population of camels is of 295,000 head. The production of the camel milk per day and annual in Algeria is respectively 3 kg and 1,460 kg [3]. Camel is a unique animal having the ability to survive with low cost of feeding under difficult climatic conditions compared to other animals. It is a good source of meat in areas where the climate adversely affects efficiency of other animal's production [5].

The camel (*Camelus dromedarius*) is of significant socio-economic importance in many arid and semi-arid parts of the world and its milk constitutes an important component of human diets in these regions. The milk is the main source of nutrition for the neonates, and provides all the essential nutrients for growth and

Corresponding author: Kihal Mebrouk, professor, research fields: food and applied microbiology. E-mail: kihalm@gmail.com.

