

COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE
ACADÉMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
FACULTÉ UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBOUX

**CARACTÉRISATION DU CONSORTIUM MICROBIEN
D'UN GRAIN DE KÉFIR**

Véronique Louise NINANE

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences
agronomiques et ingénierie biologique

Promoteur : Pr. Ph. THONART

Co-promoteurs : Dr. P. DARDENNE, Dr. G. BERBEN

2008

Ninane Véronique Louise (2008). Caractérisation du consortium microbien d'un grain de kéfir. Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, 197 p., 16 tabl., 16 fig.

Résumé: Les grains de kéfir sont des ferments lactiques constitués d'une microflore complexe et diversifiée. Celle d'un grain de kéfir (KJ) a été caractérisée par une approche méthodologique classique d'isolements microbiens sur des milieux de culture sélectifs et, pour les bactéries lactiques, par une approche indépendante d'isolements bactériens par culture. Cette dernière consistait en l'analyse de la séquence des régions V1 et V2 de l'ADNr 16S, amplifiées à partir de l'ADN extrait du grain. La sensibilité de la méthode a été augmentée à cette occasion en dissociant les amplifications géniques des populations lactiques minoritaires et majoritaires du grain. La flore identifiée dans le grain KJ comprenait *Acetobacter* sp., *Kazachstania exigua*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lb. kefir*, *Lb. parakefiri*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Leuconostoc mesenteroides*, et était dépourvue de microcoques, de pédiocoques, de *Weissella viridescens*, de bactéries indicatrices de défauts d'hygiène, de *Salmonella* sp. et de *Listeria monocytogenes*. Dans le but de vérifier le caractère complet des espèces mises à jour, une reconstitution du grain à partir des micro-organismes qui en ont été isolés a été envisagée. Des conditions expérimentales favorables à la formation de grains dans un substrat lacté ont été recherchées à partir d'extraits du grain KJ renfermant un consortium microbien *a priori* complet. Ces essais de reconstitution n'ont pas conduit à la formation de grains de kéfir mais l'un d'eux a conduit à la formation de biofilms. Cet événement a été reproduit dans du lait de façon répétable avec des consortiums reconstitués à partir des micro-organismes individuels isolés du grain KJ.

Ninane Véronique Louise (2008). Characterisation of the microbial consortium of a kefir grain (Thèse de doctorat in French). Gembloux, Belgium Gembloux Agricultural University, 197 p., 16 tabl., 16 fig.

Summary: Kefir grains are dairy starters composed of a complex and diversified microflora. The one of a kefir grain (KJ) was characterised by a classical methodological approach of microbial isolation on selective culture media and, for the lactic acid bacteria, by a culture-independent approach. This latter was the sequence analysis of the 16S rDNA V1 and V2 regions amplified from a grain DNA extract. At this occasion, the sensitivity of the method was increased by splitting up the genetic amplification of the less abundant lactic acid population from that of more abundant ones. The microflora identified in the kefir grain KJ included *Acetobacter* sp., *Kazachstania exigua*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lb. kefir*, *Lb. parakefiri*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*, and was free of micrococci, pediococci, *Weissella viridescens*, indicator bacteria of sanitary defaults, *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes*. With the aim to verify the completeness of the identified species, a reconstitution of the grain from the isolated micro-organisms was envisaged. Experimental conditions favourable to a grain formation in a milky substrate were searched with extracts of the KJ grain that contained a theoretical complete consortium. These trials of grain reconstitution didn't lead to the formation of kefir grains but one of them led to the formation of biofilms. This event was repeatably reproduced in milk with consortiums that were reconstituted from the individual micro-organisms isolated from the KJ grain.

Copyright. Aux termes de la loi belge du 22 mars 1886, sur le droit d'auteur, seul l'auteur a le droit de reproduire cet ouvrage ou d'en autoriser la reproduction de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation avec la loi.

*Ce travail fut une expérience intense,
passionnante et enrichissante,*

Qui, sans vous,

*Chers parents, chers amis,
chers collègues,*

N'aurait pas vu le jour.

*Pour votre patience, vos encouragements
et vos judicieux conseils,*

Je tiens à vous dire

MERCI.

SOMMAIRE

| | |
|--|------------|
| RÉSUMÉ | 3 |
| SUMMARY | 7 |
| 1 INTRODUCTION | 11 |
| 1.1 Grains de kéfir | 13 |
| 1.2 Préparation et qualité du kéfir | 24 |
| 1.3 Perspectives de développement | 35 |
| 1.4 Méthodes d'identification des bactéries lactiques | 46 |
| 1.5 Objectifs du travail | 55 |
| 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES | 59 |
| 2.1 Matériel biologique | 59 |
| 2.2 Qualité hygiénique du grain de kéfir KJ | 60 |
| 2.3 Identification et quantification des groupes microbiens du grain de kéfir KJ | 61 |
| 2.4 Identification moléculaire des bactéries lactiques du grain de kéfir KJ | 64 |
| 2.5 Isolement des micro-organismes du grain de kéfir KJ et identification des isolats | 69 |
| 2.6 Formation du grain de kéfir KJ | 73 |
| 3 RÉSULTATS | 77 |
| 3.1 Qualité hygiénique du grain de kéfir KJ | 77 |
| 3.2 Identification et quantification des groupes microbiens du grain de kéfir KJ | 79 |
| 3.3 Identification moléculaire des bactéries lactiques du grain de kéfir KJ | 85 |
| 3.4 Identification des isolats microbiens | 100 |
| 3.5 Formation du grain de kéfir KJ | 111 |
| 4 DISCUSSION | 129 |
| 4.1 Qualité hygiénique du grain de kéfir KJ | 129 |
| 4.2 Identification et quantification des groupes microbiens du grain de kéfir KJ | 133 |
| 4.3 Identification moléculaire des bactéries lactiques du grain de kéfir KJ | 139 |
| 4.4 Composition microbienne du grain de kéfir KJ | 146 |
| 4.5 Formation du grain de kéfir KJ | 149 |
| 5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 157 |
| 5.1 Caractéristiques microbiennes du grain de kéfir KJ | 157 |
| 5.2 Atouts, contraintes et performances de la méthode moléculaire d'identification des bactéries lactiques | 160 |
| 5.3 Avancées en matière de reconstitution d'un grain de kéfir | 162 |
| ANNEXE I : ANCIENNES DÉNOMINATIONS DES MICRO-ORGANISMES DU KÉFIR | 167 |

| | |
|--|------------|
| ANNEXE II : CODE DES ACIDES NUCLÉIQUES DE L'UNION INTERNATIONALE DE BIOCHIMIE (CORNISH-BOWDEN, 1985). | 169 |
| BIBLIOGRAPHIE | 171 |
| LISTE DES DOCUMENTS PUBLIÉS DANS LE CONTEXTE DE CE TRAVAIL | 187 |
| LISTE DES FIGURES | 189 |
| LISTE DES TABLEAUX | 191 |
| TABLE DES MATIÈRES | 193 |

RÉSUMÉ

Les grains de kéfir sont des ferments lactiques constitués d'une microflore complexe et diversifiée. Celle d'un grain de kéfir sélectionné pour ses qualités organoleptiques et technologiques, le grain KJ, a été caractérisée du point de vue de sa composition microbienne tant qualitative que quantitative.

Les groupes microbiens participant au consortium ont été identifiés par la méthode classique d'isolements sur des milieux de culture sélectifs. Elle a révélé la présence dans le grain KJ de lactobacilles, de coques lactiques, de leuconostocs, de bactéries acétiques et de levures. Parallèlement, elle a montré que le grain KJ était dépourvu de microcoques, de pédiocoques, de *Weissella viridescens*, de bactéries indicatrices de défauts d'hygiène ainsi que des germes de la flore pathogène prévalant dans nos régions et susceptible de se développer dans cette matrice (*Listeria monocytogenes* et *Salmonella* sp.).

L'identification de *Acetobacter* sp. et de *Kazachstania exigua*, la bactérie acétique et la levure du grain KJ, a été déterminée par des méthodes phénotypiques et/ou moléculaires appliquées à des souches isolées du grain. L'identification de la flore lactique du grain KJ, plus diversifiée dans les grains que la flore acétique et plus délicate à mettre en évidence par culture que les levures, a été effectuée par une approche indépendante d'isolements bactériens par culture. Elle consistait en l'analyse de séquences du gène codant pour l'ARNr 16S amplifiées à partir de l'ADN directement extrait d'un grain. L'identification des bactéries à l'origine des séquences a été déterminée par comparaison avec des séquences d'origine connue. La comparaison portait sur de courtes régions ciblées de l'ADNr 16S, d'une centaine de nucléotides. Le pouvoir discriminant des régions ciblées de l'ADNr 16S était suffisant pour garantir une identification fiable des lactobacilles et des coques lactiques de grains de kéfir au niveau taxonomique de l'espèce mais n'autorisait une identification fiable des leuconostocs qu'au niveau du genre. Dans l'approche appliquée, le nombre de séquences examinées détermine la sensibilité de la méthode. Il a été rationalisé en dissociant l'ADNr 16S des populations lactiques minoritaires et majoritaires du grain à l'occasion de l'amplification génique. Le nombre de séquences examinées dans chacun des pools d'amplification a été fixé de façon à détecter les espèces dominantes de tous les groupes lactiques identifiés dans le grain de kéfir KJ et de ceux dont la présence était pressentie sur base des données de la littérature : lactobacilles homofermentaires, lactobacilles hétérofermentaires, coques lactiques

et leuconostocs. Cette stratégie a révélé la présence dans le grain KJ de cinq espèces lactiques : *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lb. kefir*, *Lb. parakefir*, *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc* sp. La diversité des bactéries lactiques qu'elle a permise de mettre en évidence dans le grain KJ était représentative de celle de grains de kéfir.

L'identification moléculaire des bactéries lactiques a été confirmée par une analyse des caractéristiques phénotypiques de souches isolées du grain KJ. Elle a, parallèlement, été précisée à des niveaux taxonomiques plus fins pour les taxons le requérant. L'identification de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* et de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a été précisée à partir de leur profil fermentaire et celle de *Leuconostoc mesenteroides*, à partir du profil de migration de ses protéines cellulaires.

La composition quantitative moyenne de la flore banale identifiée dans le grain KJ était, en terme d'unités viables (ufc.g⁻¹), de : $1,4 \cdot 10^8$ lactobacilles, $3,9 \cdot 10^4$ coques lactiques, $1,5 \cdot 10^5$ leuconostocs, $4,0 \cdot 10^7$ bactéries acétiques et $1,1 \cdot 10^7$ levures. Dans les conditions de culture appliquées au laboratoire, qui relevaient de pratiques usuelles de culture de grains de kéfir, la composition quantitative du grain KJ variait non seulement au cours du temps mais aussi entre les cultures individuelles entretenues et incubées en parallèle. La variabilité de l'abondance du grain KJ en lactobacilles, en coques lactiques et en levures, exprimée par l'écart type relatif géométrique des dénombrements, atteignait ainsi respectivement 41 %, 420 % et 43 %. Les sources potentielles de variabilité ont été identifiées ; elles concernaient la température initiale du lait de renouvellement des cultures, l'intensité du rinçage des grains et l'hétérogénéité de l'environnement immédiat des grains liée notamment à la pratique d'une culture statique de grain. L'hétérogénéité de l'environnement immédiat des grains était la principale source potentielle de variabilité pour les lactobacilles et les levures.

Les grains de kéfir sont des associations symbiotiques qui se forment spontanément dans une région géographique déterminée (Caucase). Nulle part ailleurs un grain de kéfir n'a, à ce jour, été constitué. Des paramètres potentiellement déterminants à une formation de grain *in vitro* ont été recherchés par l'observation du comportement d'extraits microbiens du grain KJ soumis à des conditions de culture favorables à un tel processus. La simulation expérimentale des événements et conditions de formation *in situ*, déduits de descriptions bibliographiques, ne conduisaient pas à la reconstitution du grain KJ.

Une constitution du grain dans ces conditions supposait un processus de formation incluant une phase de croissance des petites structures de grain formées par le consortium dans un environnement de caillé. L'éventualité d'un processus impliquant une phase de croissance des petites structures de grain KJ dans du lait a été considérée. Des petites structures de grain KJ, représentées expérimentalement par des fragments de grains, ont été incubées dans du lait nature et dans du lait modifié de façon à, notamment, promouvoir la constitution de la matrice des grains. Le lait, nature ou modifié, s'est révélé inapproprié à leur croissance, et même dans certains cas à leur préservation, et rendait improbable un processus de formation du grain par croissance de petites structures de ce grain dans ce substrat.

Parallèlement, le consortium du grain KJ formait des structures microbiennes qui se présentaient sous la forme de biofilms souples flottant dans le lait. Ces structures microbiennes différaient de grains de kéfir notamment par leur consistance plus molle. L'anomalie au niveau de la cohésion de leur matrice et l'incapacité des petites structures de grain KJ à croître dans du lait, qui est le substrat naturel de ce consortium, pourrait traduire l'absence dans le grain KJ d'un intervenant microbien permettant d'amorcer la constitution du grain.

La formation de biofilms par le consortium du grain KJ était par ailleurs un évènement aléatoire, probablement en raison de la variabilité de la composition microbienne quantitative du grain KJ. A partir d'un consortium reconstitué avec des cultures standardisées de souches isolées du grain KJ, la formation de biofilms était reproductible. La littérature laisse indirectement penser que l'occurrence occasionnelle d'un tel évènement *in situ* est possible. Un processus de formation faisant intervenir une telle structure intermédiaire, en tant que milieu de croissance de petites structures de grain KJ ou en tant que structure primaire évoluant vers une structure mature de grain, est dès lors une hypothèse plausible.

SUMMARY

Kefir grains are dairy starters composed of a complex and diversified microflora. The one of a particular kefir grain selected for its organoleptic and technological qualities, the KJ grain, was characterised with respect to its microbial composition, as well qualitatively as quantitatively.

The microbial clusters participating in the consortium were identified by the classical method of microbial isolation on selective culture media. This method revealed the presence in the KJ grain of lactobacilli, lactic acid streptococci, leuconostocs, acetic acid bacteria and yeasts. In parallel, it showed that the KJ grain was free of micrococci, pediococci, *Weissella viridescens*, indicator organisms of hygienic defects as well as the microbes of the pathogenic microflora occurring in our countries and that is able to grow in the grain matrix (*Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp.).

The identification of *Acetobacter* sp. and of *Kazachstania exigua*, the acetic acid bacteria and the yeast of the kefir grain KJ, was determined by phenotypic and/or molecular methods applied on strains isolated from the grain. Due to the larger diversity of the lactic acid microflora of the grain compared to that of the acetic acid one and to its more delicate cultivation compared to that of the yeasts, the lactic acid bacteria identification was achieved by a culture-independent approach focussing on the 16S rDNA sequences directly amplified from a grain DNA extract. The identification of the bacteria to which the sequences belonged was determined by comparison with sequences of known origins. This comparison concerned short targeted regions of the 16S rDNA of about a hundred nucleotides. The discriminating power of the targeted regions of the 16S rDNA was sufficient to guarantee an accurate identification of the lactobacilli and the lactic acid streptococci of kefir grains at the species taxonomic level but barely agreed an accurate identification of the leuconostocs at the genus level. In the considered approach, the number of sequences analysed determines the sensitivity of the method. This was rationalized by splitting up the 16S rDNA from the less and the more abundant lactic populations of the grain when genomic DNA was amplified. The number of sequences analysed within each pool of amplified 16S rDNA was set in such a way that the major species of all the lactic acid groups of the kefir grain KJ that were identified and suspected to contribute to the microflora on the basis of published data could be detected. Those concerned the homofermentative lactobacilli, the heterofermentative lactobacilli, the

lactic acid streptococci and the leuconostocs. This strategy revealed the presence in the KJ grain of five lactic acid bacterial species: *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lb. kefiri*, *Lb. parakefiri*, *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc* sp. The diversity of the lactic acid bacteria that were highlighted by this way was in accordance with this of kefir grains.

The molecular identification of the lactic acid bacteria was confirmed by an analysis of the phenotypic traits of strains isolated from the KJ grain. In parallel, it was specified at a lower taxonomic level for the taxa that required it. Sub-species identification was specified by their fermentative profiles for *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* and for *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, and by the fingerprint of its cellular proteins for species identification of *Leuconostoc mesenteroides*.

The mean quantitative composition of the non-pathogenic microflora identified in the KJ grain was, in terms of viable counts (cfu.g⁻¹), of: $1,4 \cdot 10^8$ lactobacilli, $3,9 \cdot 10^4$ lactic acid streptococci, $1,5 \cdot 10^5$ leuconostocs, $4,0 \cdot 10^7$ acetic bacteria and $1,1 \cdot 10^7$ yeasts. In the culture conditions applied at the laboratory, which correspond to custom cultivation practices, the quantitative composition of the KJ grain varied not only in the course of time but also between the individual cultures handled and incubated in parallel. The variability of the KJ grain abundance in lactobacilli, lactic acid streptococci and yeasts, expressed by the geometric relative standard deviation of the enumerations, reached 41 %, 420 % and 43 % respectively. The potential sources of variability were identified: they concerned the initial temperature of the milk for culture renewal, the grain rinsing intensity and the heterogeneity of the environment close to the grains that was linked among others to the practice of a static grain culture. The heterogeneity of the environment close to the grains was the major potential source of variation for the lactobacilli and the yeasts.

Kefir grains are symbiotic associations that set up spontaneously in a particular geographic region (Caucasus). Nowhere else a kefir grain was ever constituted up to now. Potential parameters that might determine a grain setting up *in vitro* were searched through the observation of the behaviour of KJ grain microbial extracts maintained under culture conditions that favoured this process. The experimental simulation of the *in situ* setting up events and conditions, deduced from the bibliographic descriptions, didn't lead to the reconstitution of the KJ grain.

A grain constitution in those conditions presupposed a setting up process that includes the growth of the small grain structures formed by the consortium in an environment of curds. The possibility of a process implying a growth of the small KJ grain structures in milk was considered. Small grain structures, that were fragments of grains, were incubated in regular milk and in modified milk that might promote the constitution of the grain matrix. Both, regular and modified milk, appeared inappropriate for their growth and made unlikely a grain setting up process by growth of small structures of this grain in this substrate.

In parallel, the consortium of the grain was able to set up microbial structures that looked like supple biofilms floating in the milk. Those microbial structures differed from grains by, among others, their softer consistency. The anomaly in the cohesion of their matrix and the inability of the small KJ grain structures to grow in milk, that is the natural substrate of this consortium, might suggest that a microbial participant needed to initiate the grain setting up could lack in the consortium of the mature KJ grain.

The setting up of biofilms by the KJ consortium was moreover a random event, probably due to the variability of the quantitative microbial composition of the KJ grain. Starting with a reconstituted consortium made of standardised cultures issued from strains isolated from the KJ grain, led to a reproducible setting up of a biofilm. Published descriptions about kefir grains indirectly suggest that such an event might occasionally take place *in situ*. A process of grain setting up involving such an intermediate structure, as the environment in which small KJ grain structures can grow or as a primary structure that evolves to a mature grain, is therefore a plausible hypothesis.

1 INTRODUCTION

Le kéfir est un lait fermenté dont l'existence est antérieure aux premiers textes le décrivant. La description de sa genèse repose dès lors sur une transmission orale des éléments de son histoire qui reste, aujourd'hui encore, dépourvue d'appuis scientifiques formels. Voici ce que Beijerinck (1889)¹, un microbiologiste du XIX^{ème} siècle qui s'intéressait aux fermentations spontanées, en dit :

"Par kéfir on entend le ferment du lait des tribus montagnardes du Caucase, et aussi la boisson résultant de son action sur le lait. Le vrai nom de cette boisson, toutefois, est "sakwaska". Pour la clarté du discours on désignera le ferment sous le nom de "grains de kéfir".

Selon toute probabilité, le kéfir dérive du koumis et en est une forme améliorée. Comment cette dérivation s'est faite, c'est ce qu'on ne sait pas d'une manière certaine, mais la tradition de fabrication d'un tel produit paraît digne de foi.

Les anciens peuples du Caucase apportèrent un premier perfectionnement à la préparation du koumis en n'employant plus, comme le font encore aujourd'hui les nomades de l'Asie centrale, du lait de jument mais du lait de vache ou de chèvre.

Cette préparation se faisait d'abord dans des vaisseaux de bois en chêne qui n'étaient jamais nettoyés : après la fin de la fermentation, établie spontanément, on ne les vidait qu'en partie, puis on ajoutait de nouveau du lait frais. Bien qu'il doive y avoir de grandes chances pour que, dans le liquide ainsi dilué, la fermentation primitive recommence et se continue de la même manière, il paraît pourtant s'être produit fréquemment des altérations du produit qui firent rechercher un procédé meilleur et plus sûr. Celui-ci fut trouvé dans l'emploi de caillettes de veau ou de mouton, déposées sur le fond des récipients en chêne et restant dans un état de repos aussi parfait que possible.

On vit alors se former çà et là, sur le bois des parois, des grains de kéfir qui ensuite furent reconnus capables de provoquer seuls la fermentation voulue (...). Les grumeaux de

¹ Beijerinck M.W., 1889. Sur le kéfir. *Arch. Néerl. Sci. Exactes Nat.* **23**, 428-444. Cité par : Pidoux, 1984.

ferment eux-mêmes s'accroissent, quoique lentement, et au bout de quelques temps, ils se séparent en fragments plus petits."

La préparation et la consommation courante de kéfir se sont depuis lors étendues à une région plus vaste que les montagnes du Caucase et le kéfir est aujourd'hui plus largement considéré comme un lait fermenté traditionnel des pays de l'Est.

Le kéfir serait dans ces pays la boisson la plus populaire... après la vodka. Chiffrée, la consommation annuelle moyenne de kéfir en Union Soviétique était estimée à quelque 5 litres par personne dans les années 80 (Kosikowski, 1982). En 1997, les seuls Moscovites en auraient consommé quotidiennement 400 tonnes (Reynaud, 1997), ce qui équivaut à environ 16 litres par personne et par an. Dans ces pays, la demande en kéfir justifiait une production à l'échelle industrielle : en 1981, Lacrosse rapporte que des laiteries roumaines produisaient jusqu'à 100.000 litres de kéfir par jour, tandis qu'une centaine de laiteries polonaises en produisaient respectivement 22 et 32 millions de litres en 1982 et en 1988 (Libudzisz & Piatkiewicz, 1990). Aujourd'hui, de grands groupes laitiers comme Danone ou Valio investissent dans des lignes locales de production de kéfir (Anonyme Groupe Danone, 2006 ; Anonyme Valio, 2007). Le groupe Danone, qui occupe une place prépondérante dans le marché des produits laitiers frais, a bien compris l'attachement des populations de l'Est au kéfir. Pour tenir compte des habitudes alimentaires locales, Activia, un de ses produits phares, a été réinterprété : le yaourt au bifidus actif que l'on connaît chez nous est ainsi devenu un lait fermenté de type kéfir pour le marché russe (Anonyme Groupe Danone, 2007).

Le kéfir est connu bien au-delà des frontières soviétiques, comme en témoigne la provenance des grains utilisés dans les études publiées. Ces grains ont en effet été collectés auprès de particuliers habitant des pays aussi divers que l'Afrique du Sud (Witthuhn *et al.*, 2004), Taiwan (Kuo & Lin, 1999), l'Argentine (Garrote *et al.*, 1998), le Portugal (Pintado *et al.*, 1996), l'Espagne (Angulo *et al.*, 1993), la France (Vayssier, 1978), l'Irlande (Rea *et al.*, 1996), l'Allemagne (Neve, 1992) ou la Belgique (Ninane *et al.*, 2005a). En Belgique, la Station laitière de l'Etat, aujourd'hui intégrée au Département Qualité des productions agricoles du Centre wallon de Recherches agronomiques (CRA-W, Gembloux, Belgique), en distribue depuis 1950 (Jamotte, 1974).

Le kéfir est connu en d'autres régions encore, notamment aux Etats-Unis : un immigrant russe, Mike Smolyansky, y créa en 1986 une manufacture d'aliments "santé",

Lifeway Foods, dont la production principale est du kéfir (Anonyme Lifeway, 2005). La percée de ce produit sur le marché américain n'est toutefois pas précisée et il semblerait que, hors des frontières de l'ex Union Soviétique, la production du kéfir soit le plus souvent limitée à une échelle domestique ou artisanale. En Belgique, le personnel du Service des ferments du CRA-W, qui examine systématiquement la variété des laits fermentés proposés par les centres de distribution, n'a jusqu'à présent que rarement constaté la présence de kéfir dans le rayon "frais" des supermarchés.

1.1 Grains de kéfir

1.1.1 Structure des grains de kéfir

Les grains de kéfir sont décrits comme étant de "*petites masses ridées, à consistance gélatineuse, de grosseur variable*" (Jamotte, 1974), des "*granules irréguliers gélatineux, blanchâtres ou jaunâtres, de la taille d'une noix*" (Kosikowski, 1982) ou encore de "*petites masses blanches élastiques, en forme de chou-fleur*" (Pidoux, 1984). Si l'apparence d'un chou-fleur est souvent évoquée pour décrire des grains de kéfir (Duitschaever *et al.*, 1988 ; Arihara *et al.*, 1990 ; Neve, 1992 ; Abraham & De Antoni, 1999 ; Kuo & Lin, 1999), elle n'en est pas pour autant exclusive : Marshall & Cole (1984) illustrent des formes variées de grains (Figure 1.1.1) et en décrivent comme "*pouvant être déroulés en une sorte de feuille*".

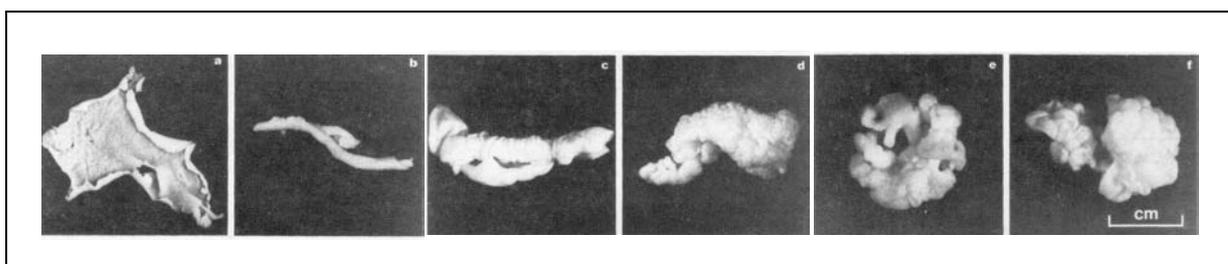


Figure 1.1.1 : Illustration de grains de kéfir (Marshall & Cole, 1984) ; a : grain en forme de "feuille" ; b : grain en forme de "feuille enroulée" ; c & d : grain de forme non définie ; e & f : grain en forme de "chou-fleur". Reproduit avec l'aimable autorisation de la Fédération internationale de laiterie (FIL-IDF, Building Diamant, 80 Bd A. Reyers, 1030 Bruxelles, Belgique).

La dimension des grains de kéfir est variable et homogène ou hétérogène au sein d'un lot selon qu'ils sont petits ou plus gros. Les grains de Bottazzi & Bianchi (1980) ont 2 à 3 mm de diamètre tandis que ceux de Abraham & De Antoni (1999) ont un diamètre compris entre 1 et 40 mm.

Observés en microscopie électronique (Bottazzi & Bianchi, 1980 ; Molska *et al.*, 1980 ; Marshall & Cole, 1984 ; Duitschaever *et al.*, 1988 ; Neve, 1992 ; Rea *et al.*, 1996 ; Guzel-Seydim *et al.*, 2005), les grains de kéfir révèlent la présence de bactéries et de levures étroitement associées à une matrice spongieuse (Figure 1.1.2). Tous les grains examinés par ces auteurs recèlent des bactéries en forme de bacille ; des bactéries en forme de coque y sont par contre sporadiquement observables.

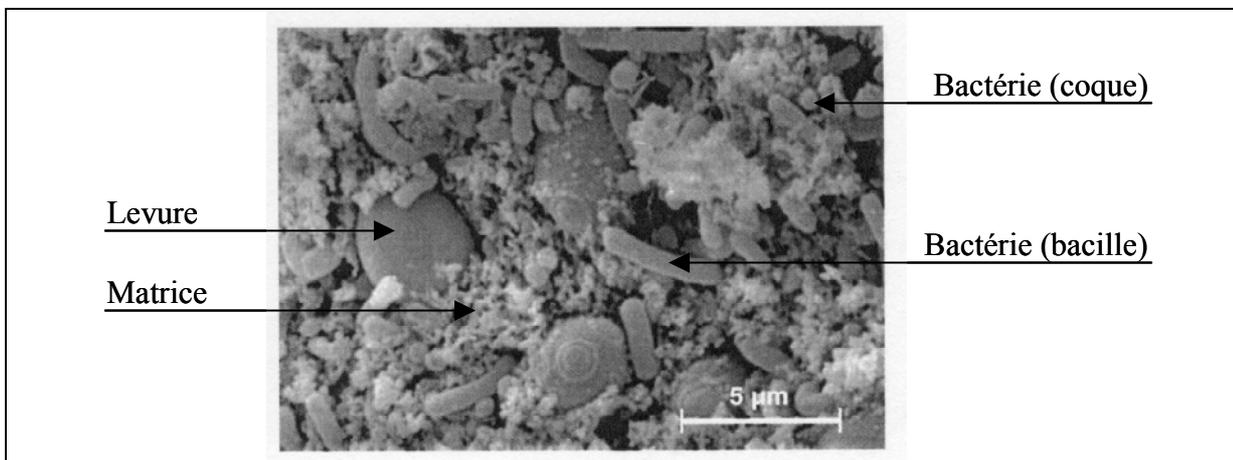


Figure 1.1.2 : Illustration d'un grain de kéfir en grossissement de 7000 X (Guzel-Seydim *et al.*, 2005). Reproduit avec l'aimable autorisation de Wiley-Blackwell Publishing (Oxford, UK).

Molska *et al.* (1980) relèvent de ces observations microscopiques une absence d'agencement structuré entre les bactéries et les levures. Tous s'accordent à dire que les bactéries et les levures sont inégalement réparties dans le grain. Toutefois, tandis que certains observent une plus grande concentration de levures à la surface du grain et une plus grande concentration de bactéries à l'intérieur du grain (Molska *et al.*, 1980 ; Marshall & Cole, 1984 ; Guzel-Seydim *et al.*, 2005), d'autres observent le contraire (Bottazzi & Bianchi, 1980 ; Duitschaever *et al.*, 1988). Rea *et al.* (1996) confirment cette différence de répartition entre grains et précisent qu'elle existe aussi au sein d'un même grain : qu'elle soit effectuée à la surface ou au cœur du grain, la répartition de ces micro-organismes varie en fonction de la

coupe examinée. Lorsqu'elles sont observables, les bactéries en forme de coque ont toutefois toujours été localisées à la surface du grain (Rea *et al.*, 1996 ; Guzel-Seydim *et al.*, 2005).

1.1.2 Microflore des grains de kéfir

Composition microbienne qualitative des grains de kéfir

Les études publiées sur la composition microbienne de grains de kéfir mettent en lumière une microflore complexe, souvent composée de plusieurs espèces de bactéries lactiques et de levures, parfois associées à d'autres micro-organismes (Tableau 1.1.1).

La microflore identifiée à partir de grains de kéfir comprend de nombreuses espèces, associées dans les grains de kéfir en diverses combinaisons (Tableau 1.1.1). A celles recensées dans le Tableau 1.1.1, viennent s'ajouter *Lactobacillus crispatus* et *Lb. gallinarum* identifiées à partir de grains de kéfir dont les compositions microbiennes ne sont pas clairement précisées (Garbers *et al.*, 2004).

Parmi les bactéries lactiques recensées, la majorité des espèces appartient au genre *Lactobacillus*. Elle inclut des espèces homofermentaires : *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri*, *Lb. helveticus*, *Lb. kefiranofaciens* ; et des espèces hétérofermentaires facultatives ou obligatoires : *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. fermentum*, *Lb. kefiri*, *Lb. paracasei*, *Lb. parakefiri*, *Lb. plantarum* et *Lb. rhamnosus*. Les autres bactéries lactiques, représentées dans une moindre diversité d'espèces que les lactobacilles, appartiennent aux genres homofermentaires *Lactococcus* (*L. lactis*), *Pediococcus* et *Streptococcus* (*St. thermophilus*) ainsi qu'aux genres hétérofermentaires *Leuconostoc* (*Ln. mesenteroides* et *Ln. lactis*) et *Weissella* (*W. viridescens*).

Les levures isolées à partir des grains comprennent de nombreuses espèces incapables de fermenter le lactose : *Candida friedrichii*, *Candida inconspicua*, *Candida maris*, *Candida tenuis*, *Kazachstania exigua*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Torasporula delbrueckii*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces* sp., et seulement deux espèces capables de fermenter le lactose : *Kluyveromyces lactis* et *Kluyveromyces marxianus*.

Tableau 1.1.1, 1^{ère} partie : Composition microbienne de grains de kéfir. Les différentes espèces sont mentionnées sous leur appellation actuelle ; un tableau reprenant les anciennes dénominations utilisées par les différents auteurs est donné en Annexe I.

| Références | Grain (*) | Bactéries lactiques | Levures | Autres groupes microbiens |
|--------------------------------|-----------|--|--|---|
| Ottogalli <i>et al.</i> , 1973 | I | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> "Leuconostoc kephir" | <i>Kluyveromyces lactis</i> | Pas de bactéries acétiques |
| Ottogalli <i>et al.</i> , 1973 | II | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>Candida tenuis</i> | <i>Acetobacter pasteurianus</i> |
| Ottogalli <i>et al.</i> , 1973 | III | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> "Leuconostoc kephir" | <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Pas de bactéries acétiques |
| Ottogalli <i>et al.</i> , 1973 | IV | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |
| Angulo <i>et al.</i> , 1993 | I | <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus kefiri</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> subsp. <i>paracasei</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> | <i>Acetobacter</i> sp. <i>Escherichia coli</i> |
| Angulo <i>et al.</i> , 1993 | II | <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>Candida friedrichii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces unisporus</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> | <i>Acetobacter</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. |
| Angulo <i>et al.</i> , 1993 | III | <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Weissella viridescens</i> | <i>Candida friedrichii</i> <i>Kazachstania exigua</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> | <i>Bacillus</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. |
| Angulo <i>et al.</i> , 1993 | IV | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Weissella viridescens</i> | <i>Saccharomyces unisporus</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> | <i>Acetobacter</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. |
| Angulo <i>et al.</i> , 1993 | V | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Weissella viridescens</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> | <i>Micrococcus</i> sp. |
| Angulo <i>et al.</i> , 1993 | VI | <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>Bacillus</i> sp. |

(*) Dénomination, donnée par les auteurs, du grain sous objet.

Tableau 1.1.1, 2^{ème} partie : Composition microbienne de grains de kéfir. Les différentes espèces sont mentionnées sous leur appellation actuelle ; un tableau reprenant les anciennes dénominations utilisées par les différents auteurs est donné en Annexe I.

| Références | Grain (*) | Bactéries lactiques | Levures | Autres groupes microbiens |
|-------------------------------|-----------|--|--|---|
| Angulo <i>et al.</i> , 1993 | VII | <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Weissella viridescens</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> | <i>Bacillus</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. |
| Angulo <i>et al.</i> , 1993 | VIII | <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Pediococcus</i> sp. | <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> | <i>Bacillus</i> sp. |
| Pintado <i>et al.</i> , 1996 | | <i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>Saccharomyces unisporus</i> | Pas de bactéries acétiques |
| Takizawa <i>et al.</i> , 1998 | | <i>Lactobacillus kefir</i> subsp. <i>kefir</i> subsp. <i>kefirgranum</i> <i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactobacillus parakefir</i> (**) | Pas recherchées | Pas recherchés |
| Lin <i>et al.</i> , 1999a | | <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Pichia fermentans</i> | Pas recherchés |
| Garrote <i>et al.</i> , 2001 | I | <i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | <i>Saccharomyces</i> sp. | <i>Acetobacter</i> sp. |
| Garrote <i>et al.</i> , 2001 | II | <i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactobacillus parakefir</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Saccharomyces</i> sp. | <i>Acetobacter</i> sp. |
| Garrote <i>et al.</i> , 2001 | III | <i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>Saccharomyces</i> sp. | <i>Acetobacter</i> sp. |
| Garrote <i>et al.</i> , 2001 | IV | <i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>Saccharomyces</i> sp. | <i>Acetobacter</i> sp. |
| Simova <i>et al.</i> , 2002 | | <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> | <i>Candida inconspicua</i> <i>Candida maris</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Pas recherchés |

(*) Dénomination, donnée par les auteurs, du grain sous objet.

(**) Les bactéries lactiques appartenant à d'autres genres n'ont pas été recherchées.

Tableau 1.1.1, 3^{ème} partie : Composition microbienne de grains de kéfir. Les différentes espèces sont mentionnées sous leur appellation actuelle ; un tableau reprenant les anciennes dénominations utilisées par les différents auteurs est donné en Annexe I.

| Références | Grain (*) | Bactéries lactiques | Levures | Autres groupes microbiens |
|--------------------------------|-----------|---|---|--|
| Witthuhn <i>et al.</i> , 2004 | I | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> | <i>Zygosaccharomyces</i> sp. | Pas de bactéries acétiques ou propioniques |
| Witthuhn <i>et al.</i> , 2004 | II | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> | Néant | Pas de bactéries acétiques ou propioniques |
| Witthuhn <i>et al.</i> , 2004 | III | <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Leuconostoc lactis</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Yarrowia lipolytica</i> | Pas de bactéries acétiques ou propioniques |
| Witthuhn <i>et al.</i> , 2004 | IV | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | Pas de bactéries acétiques ou propioniques |
| Witthuhn <i>et al.</i> , 2004 | V | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>Yarrowia lipolytica</i> | Pas de bactéries acétiques ou propioniques |
| Witthuhn <i>et al.</i> , 2004 | VI | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Yarrowia lipolytica</i> | Pas de bactéries acétiques ou propioniques |
| Witthuhn <i>et al.</i> , 2004 | VII | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | <i>Kazachstania exigua</i> | Pas de bactéries acétiques ou propioniques |
| Witthuhn <i>et al.</i> , 2004 | VIII | <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Leuconostoc lactis</i> | <i>Kazachstania exigua</i> <i>Zygosaccharomyces</i> sp. | Pas de bactéries acétiques ou propioniques |
| Mainville <i>et al.</i> , 2006 | | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> <i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> | Pas recherchées | Pas recherchés |
| Wang <i>et al.</i> , 2006 | | <i>Lactobacillus</i> sp. | Pas recherchées | <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Sphingobacterium</i> sp. |
| Chen <i>et al.</i> , 2008 | Hsinchu | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> <i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | Pas recherchées | <i>Pseudomonas</i> sp. |

(*) Dénomination, donnée par les auteurs, du grain sous objet.

Tableau 1.1.1, 4^{ème} partie : Composition microbienne de grains de kéfir. Les différentes espèces sont mentionnées sous leur appellation actuelle ; un tableau reprenant les anciennes dénominations utilisées par les différents auteurs est donné en Annexe I.

| Références | Grain (*) | Bactéries lactiques | Levures | Autres groupes microbiens |
|---------------------------|-----------|---|-----------------|---|
| Chen <i>et al.</i> , 2008 | Mongolia | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> <i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | Pas recherchées | <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas</i> sp. |
| Chen <i>et al.</i> , 2008 | Iran | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> <i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | Pas recherchées | <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas</i> sp. |

(*) Dénomination, donnée par les auteurs, du grain sous objet.

Les autres micro-organismes, identifiés occasionnellement dans des grains de kéfir, comprennent des bactéries d'intérêt alimentaire : *Acetobacter* sp. et *Micrococcus* sp., et des bactéries contaminantes : *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. et *Sphingobacterium* sp.

Composition microbienne quantitative des grains de kéfir

Du point de vue quantitatif, les grains de kéfir renferment un nombre variable de bactéries lactiques et de levures. Les valeurs extrêmes d'abondance de ces deux groupes microbiens sont publiées par Garrote *et al.* (2001) et Guzel-Seydim *et al.* (2005) ; elles sont de $1,5 \cdot 10^8$ ufc.g⁻¹ et 10^9 ufc.g⁻¹ pour les bactéries lactiques et de 10^6 ufc.g⁻¹ et $2,8 \cdot 10^8$ ufc.g⁻¹ pour les levures. Lorsque les différentes composantes des bactéries lactiques sont dénombrées individuellement, les quantités chiffrées de lactobacilles sont comprises entre $1,2 \cdot 10^7$ ufc.g⁻¹ et $1,4 \cdot 10^8$ ufc.g⁻¹ et celles de coques lactiques entre $1,0 \cdot 10^6$ ufc.g⁻¹ et $1,3 \cdot 10^7$ ufc.g⁻¹ (Abraham & De Antoni, 1999).

La flore bactérienne lactique des grains de kéfir est présentée comme dominante par rapport à celle des levures (Kosikowski, 1982). La comparaison des données publiées relatives aux dénombrements des différents groupes microbiens montre qu'effectivement la population de bactéries lactiques domine, ou est à tout le moins présente en quantité équivalente à celle des levures, dans la plupart des grains de kéfir étudiés (Vayssier, 1978 ; Molska *et al.*, 1980 ; Angulo *et al.*, 1993 ; Pintado *et al.*, 1996, Garrote *et al.*, 2001 ; Witthuhn

et al., 2004 ; Guzel-Seydim *et al.*, 2005). Chiffrée, la représentativité de cette population est alors variable : comprise entre 83 % et 90 % de la flore totale de grains bulgares (Simova *et al.*, 2002), la population de bactéries lactiques est 1000 fois plus élevée que celle des levures dans des grains turques (Guzel-Seydim *et al.*, 2005). Dans certains grains toutefois, la population des levures est plus abondante que celle des bactéries lactiques. C'est le cas pour trois des huit grains d'origines différentes étudiés par Angulo *et al.* (1993) et pour quatre des huit grains étudiés par Witthuhn *et al.* (2004).

La flore bactérienne des grains de kéfir est le plus souvent dominée par des lactobacilles (Molska *et al.*, 1980 ; Pintado *et al.*, 1996 ; Garrote *et al.*, 1997 ; Abraham & De Antoni, 1999) mais peut être dominée par des coques lactiques. Dans ce cas, les coques lactiques représentent jusqu'à 65 % de la flore totale du grain (Simova *et al.*, 2002).

La composition microbienne de grains de kéfir n'inclut pas nécessairement des espèces appartenant à chacun des types fermentaires de lactobacilles : certaines comprennent exclusivement des lactobacilles hétérofermentaires et d'autres, un unique lactobacille homofermentaire (Tableau 1.1.1). Toutefois, lorsque des spécimens appartenant à chacun des types fermentaires de lactobacilles sont quantifiés dans des grains, les homofermentaires sont plus abondants que les hétérofermentaires. Kandler & Kunath (1983) dénombrent ainsi 90 % de lactobacilles homofermentaires dans une population de lactobacilles isolée de grains de diverses origines, Takizawa *et al.* (1998) en dénombrent autant dans une population de lactobacilles isolée de grains d'une unique origine, tandis que Simova *et al.* (2002) en dénombrent entre 70 et 87 % dans des populations de lactobacilles isolées individuellement de différents grains bulgares.

La flore bactérienne non lactique des grains de kéfir, considérée comme contaminante, a rarement fait l'objet d'une approche quantitative... publiée ! Dans celle de Angulo *et al.* (1993), les bactéries non lactiques, toutes espèces confondues, représentent de 6,6 % à 33,3 % de la flore des grains. Parmi la flore bactérienne non lactique identifiée dans des grains de kéfir, figurent des bactéries acétiques que Garrote *et al.* (2001) ont caractérisées distinctement : leur nombre s'élève à $2,5 \cdot 10^5$ - $3,6 \cdot 10^5$ ufc.g⁻¹ de grains.

1.1.3 Matrice des grains de kéfir

Les micro-organismes contribuent, selon Abraham & De Antoni (1999), à concurrence de 0,9 % à la masse (humide) des grains de kéfir. Autrement dit, la matrice des grains en constitue la majeure partie.

Les données relatives à la composition chimique des grains de kéfir traduisent une substance essentiellement constituée d'eau, dont la fraction non aqueuse contient principalement des sucres et des protéines. La teneur en eau des grains de kéfir varie en effet entre 80 % et 90 % de leur poids tandis que les fractions polysaccharidique et protéique varient respectivement entre 36 % et 54 % et entre 28 % et 35 % de leur matière sèche (Ottogalli *et al.*, 1973 ; Garrote *et al.*, 2001).

La matrice des grains de kéfir contient un polysaccharide spécifique, jamais isolé d'un autre substrat, et nommé pour cette raison kéfirane. Les auteurs à l'origine de son identification, la Rivière *et al.* (1967), estiment que le kéfirane constitue près de la moitié de la substance cohésive des grains.

Le kéfirane est un polysaccharide soluble dans l'eau qui a la particularité de gélifier en présence d'alcool (Mukai *et al.*, 1991). Il se caractérise par une répartition binaire ou uniforme en chromatographie, correspondant à des composants de poids moléculaire d'environ 1.10^6 et 4.10^6 ou 10^7 daltons selon la source, Yokoi *et al.* (1990) ou Piermaria *et al.* (2008) respectivement. D'après Kooiman (1968), le kéfirane est composé de quantités équimolaires de D-glucose et de D-galactose agencés en un réseau d'unités de six sucres (Figure 1.1.3).

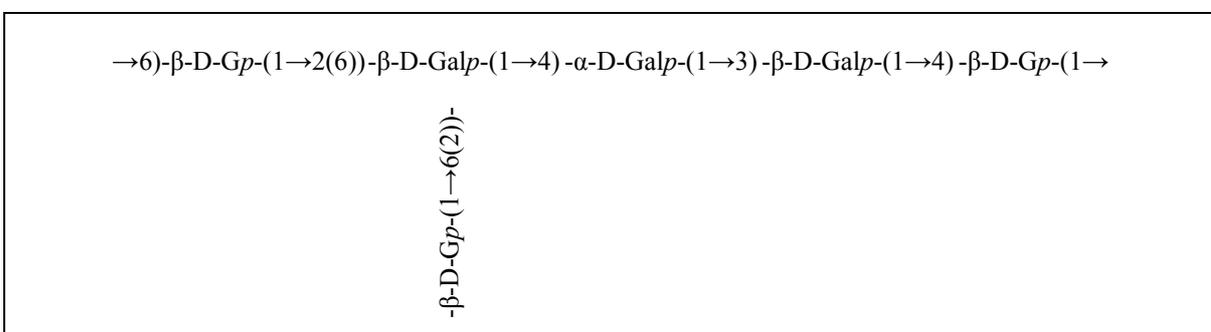


Figure 1.1.3 : Illustration de l'unité de six sucres, du D-glucose (D-G) ou du D-galactose (D-Gal), répétée dans la structure du kéfirane telle que proposée par Kooiman (1968).

Le kéfirane ne serait pas le seul constituant de la matrice des grains de kéfir dont la production a une origine microbienne. Abraham & De Antoni (1999) en émettent l'hypothèse pour des protéines. Dans leurs travaux de caractérisation des protéines de grains de kéfir, ces auteurs mettent en évidence la présence, dans les grains, de protéines qui par leur masse moléculaire élevée ne peuvent provenir des protéines du lait ou de leur dégradation.

1.1.4 Formation du grain de kéfir

Jamais un grain n'a pu être constitué *in vitro* à partir de cultures microbiennes. Les grains sont jusqu'à présent reproduits par fragmentation (Koroleva, 1988). Naturellement ou mécaniquement, des morceaux se détachent d'un grain existant et grossissent pour fournir à leur tour de petits grains.

Le mécanisme de formation des grains de kéfir reste à ce jour méconnu. Celui d'autres structures microbiennes, les biofilms, a été, par leur profusion et la pathogénie de certains, plus étudié et est documenté.

Dans la nature, le développement de bactéries en film flottant sur une surface liquide ou collé à une interface solide est fréquent ; la matière visqueuse qui couvre les vases et la plaque dentaire en sont des exemples courants. Dans ces structures, les bactéries sont assemblées dans une matrice de polymères qu'elles synthétisent. Les matrices des biofilms se composent d'éléments communs dont notamment des exopolysaccharides (Lasa, 2006). Ces exopolysaccharides bactériens ne sont généralement pas utilisés comme source énergétique par les micro-organismes qui les produisent ; la plupart d'entre-eux sont incapables de cataboliser le polymère qu'ils synthétisent. Les exopolysaccharides auraient plutôt une fonction écologique de protection vis-à-vis de facteurs de stress environnementaux et d'adhésion cellulaire (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002). Dans le processus de formation des biofilms, ils jouent un rôle prépondérant au niveau de l'adhésion des bactéries aux surfaces qu'elles colonisent (Cerning, 1990 ; Cammarota & Sant'Anna, 1998 ; Lasa, 2006).

Dans le domaine alimentaire, les propriétés agglutinantes des bactéries acétiques sont empiriquement bien connues au travers de la mère de vinaigre, ce ferment d'aspect gélatineux qui se forme spontanément dans le vinaigre. Elles s'expriment également dans le kombucha, le thé sucré fermenté par des bactéries acétiques et des levures. L'association microbienne du

kombucha est fixée dans le gel cellulosique formé à la surface de la boisson et produit par les bactéries acétiques (Chen & Liu, 2000 ; Teoh *et al.*, 2004).

Un rôle similaire a été établi dans un contexte d'agrégation microbienne plus proche de celle des grains de kéfir que les biofilms : celui des grains de kéfir dit sucré ou Gingebeer plant. Ces petites masses élastiques translucides, composées de bactéries lactiques et de levures, sont connues pour fermenter de l'eau sucrée. *Lactobacillus hilgardii*, un membre du consortium microbien de ces grains, produit un exopolysaccharide dont les propriétés agglutinantes ont été établies. Les bactéries sont dans ce cas immobilisées dans le gel de dextrane qu'elles produisent et forment des grains (Pidoux, 1989 ; Pidoux *et al.*, 1992).

Les micro-organismes à l'origine de la synthèse de kéfirane, l'exopolysaccharide bactérien identifié dans les grains de kéfir, sont des lactobacilles. Observés en microscopie dans des extraits de grains de kéfir, les micro-organismes enrobés d'une gangue mucoïdale en ont la morphologie caractéristique (la Rivière *et al.*, 1967). Parallèlement, les isolats de grains de kéfir capables de produire du kéfirane en culture pure sont tous des lactobacilles (la Rivière *et al.*, 1967 ; Toba *et al.*, 1986 ; Toba *et al.*, 1987 ; Yokoi *et al.*, 1990). Ceux isolés par les équipes de la Rivière et de Toba ont fait l'objet d'une identification plus précise et ont été assignés à deux taxons : *Lactobacillus brevis* (la Rivière *et al.*, 1967) et *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* (Fujisawa *et al.*, 1988 ; Vancanneyt *et al.*, 2004) respectivement. Ottogalli *et al.* (1973) attribuent cette propriété à *Lb. acidophilus* par déduction, après examen de la morphologie des cellules microbiennes identifiées dans le grain de kéfir étudié, mais une production de kéfirane par ces bactéries isolées en culture pure n'a jamais été établie.

Si les lactobacilles sont à l'origine de la synthèse du kéfirane, les levures en stimulent la production. En 1932 déjà, des chercheurs russes avaient souligné l'influence favorable qu'exercent les levures sur l'activité métabolique des bactéries lactiques du kéfir et sur leur croissance (Koroleva, 1988). En 1967, la Rivière et son équipe observent que la présence de levure conditionne le développement de la souche de *Lactobacillus brevis* qu'ils ont isolée de grains de kéfir et qui produit du kéfirane. Incapable de se développer dans du lait non supplémenté, cette souche y pousse bien lorsque le lait est inoculé avec une levure isolée de grains de kéfir. Ils précisent que ces conditions conduisent à une bonne formation de gangue de kéfirane autour des cellules bactériennes, propriété qui n'est pas observable dans d'autres milieux de culture. En 2003, Schoevers & Britz confirment que l'ajout d'extrait de levure au

milieu de culture conduit à une meilleure croissance des grains et à une plus grande production de polymères extracellulaires. Indépendamment, l'équipe de Cheirsilp (2003a et 2003b) montre que *Lactobacillus kefiranofaciens* produit plus de kéfirane en co-culture avec *Saccharomyces cerevisiae* qu'en culture pure, même lorsque la levure est inactivée. Elle en déduit que l'interaction à l'origine de cette stimulation de la production de kéfirane est liée à un contact physique. Aujourd'hui, c'est en présence de *S. cerevisiae* que l'optimisation des conditions de production de kéfirane par *Lb. kefiranofaciens* est envisagée (Tada *et al.*, 2007).

Un autre élément commun aux biofilms est la présence, à la surface des bactéries, de protéines de haut poids moléculaire qui leur confèrent la capacité à former un biofilm. Ces protéines associées aux biofilms (Bap) promeuvent l'adhésion primaire des cellules aux surfaces abiotiques et l'adhésion des cellules bactériennes entre-elles. Elles sont capables de provoquer un mécanisme de formation indépendant de celui de l'exopolysaccharide et confèrent aux biofilms une plus grande fermeté (Lasa, 2006). Les protéines de haut poids moléculaire mises en évidence dans des grains de kéfir par Abraham & De Antoni (1999) pourraient avoir une origine microbienne. La confirmation de cette hypothèse et leur rôle dans la formation du grain de kéfir restent toutefois en suspens.

1.2 Préparation et qualité du kéfir

1.2.1 Contribution des différents groupes microbiens aux transformations du lait

Acidification du lait

L'activité des bactéries lactiques conduit principalement à l'acidification du lait. Les bactéries lactiques se caractérisent en effet par la propriété de produire de l'acide lactique à partir de sucre, disponible sous la forme de lactose dans le lait.

Les espèces homofermentaires ont un plus grand pouvoir acidifiant que les espèces hétérofermentaires. Elles fermentent les sucres presque exclusivement en acide lactique tandis que les espèces hétérofermentaires les fermentent en deux produits terminaux : l'acide lactique et l'acide acétique ou l'éthanol. Pour être complet, signalons que cette fermentation "hétérolactique" s'accompagne d'un dégagement de CO₂.

La contribution de chacune d'elles à l'acidification du lait dépend de leur aptitude à se développer dans cet environnement qui évolue en cours de fermentation.

Dans le lait et à température ambiante, les lactocoques se développent rapidement et produisent rapidement de l'acide lactique. Ainsi, dans ces conditions, ils en produisent environ 8 g.l⁻¹ et abaissent le pH à environ 4,6 en 15 à 20 heures (Teuber, 1995). Leur croissance est ensuite inhibée par l'acidité ambiante.

Dans les mêmes conditions, *Lactobacillus casei*, un lactobacille homofermentaire, en produit 6 g.l⁻¹ seulement en 24 heures (Assadi *et al.*, 2000). Toutefois, lors de la fermentation du kéfir, son développement est stimulé par l'acidification résultant de l'activité des lactocoques. Les lactobacilles sont en effet acidophiles ; le pH auquel ils se développent le mieux se situe entre 4,0 et 4,5 (Rozier *et al.*, 1985). Par ailleurs, leur croissance peut aussi être stimulée par la présence de levures (Gueguen & Schmidt, 1992).

C'est malgré tout aux lactocoques que Koroleva (1988) attribue le rôle d'acidifiant dans la fermentation du kéfir.

Synthèse de composés aromatisants

Les bactéries lactiques produisent également des molécules participant à l'arôme du kéfir : acétaldéhyde, acétoïne, diacétyl et butanediol.

L'acétaldéhyde est un métabolite intermédiaire de la fermentation "hétérolactique" du lactose. Il est normalement réduit en éthanol chez les bactéries lactiques mésophiles mais peut être excrété comme produit final par certaines bactéries thermophiles dépourvues d'alcool-déhydrogénase. C'est le cas pour *Streptococcus thermophilus* que l'on retrouve parfois dans les grains de kéfir.

L'acétoïne, le diacétyl et le butanediol sont parfois produits à la place de l'acide lactique dans le métabolisme des sucres mais leur principal précurseur est l'acide citrique.

De nombreuses bactéries lactiques sont capables de dégrader l'acide citrique du lait en acide acétique, en CO₂ et, pour certaines d'entre-elles, en acide formique ou en composés aromatisants : acétoïne, diacétyl et butanediol. La plupart des leuconostocs "laitiers" et un biovar de *Lactococcus lactis* fermentent l'acide citrique par cette dernière voie. Dans le kéfir, les composés aromatisants qui en sont issus sont attribués à l'activité des leuconostocs (Koroleva, 1988 ; Rea *et al.*, 1996).

Les leuconostocs "laitiers" se développent le mieux à un pH proche de celui du lait et sont inhibés en milieu acide. Leur croissance s'arrête lorsque le pH interne de la cellule atteint 5,4-5,7 (Mc Donald *et al.*, 1990). Le pH externe d'inhibition dépend de la nature de l'acide organique présent (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004). En présence d'acide lactique, des souches sauvages de *Leuconostoc* sp., isolées de fromage au lait cru, ne se développent quasiment plus à un pH de 4,6 (Sánchez *et al.*, 2005). L'activité des leuconostocs "laitiers" aura dès lors lieu en début de fermentation et sera d'autant plus importante que l'acidification du lait est lente.

Synthèse d'agents texturants

Les agents texturants d'origine microbienne sont des polysaccharides de poids moléculaire élevé appelés exopolysaccharides en référence au fait qu'ils sont exocellulaires, c'est-à-dire sécrétés dans le milieu. La synthèse d'exopolysaccharide est un métabolisme répandu chez les bactéries et rare chez les levures (De Vuyst *et al.*, 2001).

Les lactobacilles *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* et *Lb. brevis* sont à l'origine de la synthèse de kéfirane, l'exopolysaccharide typique du kéfir (paragraphe 1.1.4). D'autres micro-organismes du kéfir sont toutefois susceptibles de produire des exopolysaccharides et de contribuer à sa texture. Les souches laitières productrices d'exopolysaccharides concernent plusieurs espèces qui peuvent figurer parmi le consortium microbien de grains de kéfir : *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. paracasei* et *Lb. rhamnosus* (De Vuyst *et al.*, 2001 ; Monsan *et al.*, 2001). Koroleva (1988) attribue par ailleurs un rôle texturant aux bactéries acétiques du kéfir.

Les bactéries lactiques mésophiles, comme la plupart de celles rencontrées dans le kéfir, produisent généralement un maximum d'exopolysaccharides en conditions sub-létales ; le taux de production d'exopolysaccharide est alors indépendant de la croissance bactérienne (De Vuyst *et al.*, 2001). Toutefois, dans le cas de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* et de *Lb. rhamnosus* la production d'exopolysaccharide en milieu de synthèse est corrélée à la croissance bactérienne de la souche étudiée (Cheirsilp *et al.*, 2001a ; Bergmaier, 2002). Dans l'hypothèse où cette corrélation se vérifie dans le milieu naturel, le

lait, le taux de production d'exopolysaccharide est lié aux facteurs influençant la croissance bactérienne.

Les exopolysaccharides produits par les différents micro-organismes ont des pouvoirs texturant variables qui dépendent notamment de leur composition, de leur masse moléculaire, de leur conformation spatiale et de leur habilité à interagir avec les protéines du lait (Duboc & Mollet, 2001). Par ailleurs, dans le lait, l'incorporation de quantités croissantes de polymère ne conduit pas nécessairement à une amélioration de la texture c'est-à-dire à une augmentation de la viscosité du lait fermenté (Laws & Marshall, 2001).

Lipolyse

Les micro-organismes du kéfir ont une activité lipolytique qui se traduit par la libération d'acides gras volatils participants à l'arôme de la boisson (Koroleva, 1988). La plupart des micro-organismes sont capables de sécréter des lipases et de participer à l'hydrolyse de la matière grasse. Toutefois, les levures ont en général une activité lipolytique supérieure à celle des bactéries lactiques (Talon & Montel, 1994).

Synthèse d'acide linoléique conjugué

L'acide linoléique conjugué (CLA) est un constituant de la matière grasse laitière susceptible de présenter un intérêt particulier pour la santé humaine (Khanal, 2004 ; Rainer & Heiss, 2004 ; Pariza, 2004).

La synthèse du CLA présent naturellement dans le lait est essentiellement le fruit de l'activité des bactéries du rumen. Une synthèse de CLA peut avoir lieu lors de la fermentation du lait et de la maturation des fromages. Une contribution microbienne à la synthèse de CLA dans ces produits laitiers est alors pressentie. Diverses bactéries lactiques, dont certaines souches provenant de ferments lactiques, sont effectivement capables de synthétiser du CLA *in vitro* (Jiang *et al.*, 1998 ; Lin *et al.*, 1999b ; Alonso *et al.*, 2003).

Les espèces bactériennes de grains de kéfir dont des représentants sont capables de synthétiser du CLA *in vitro* sont *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus* (Lin *et al.* 1999b).

Fermentation alcoolique

Enfin, les levures sont réputées pour leur aptitude à produire de l'alcool et du CO₂ par fermentation des sucres en absence d'oxygène. Cette caractéristique, exploitée dans la préparation du kéfir, contribue fortement à la spécificité de ce lait fermenté.

Les levures sont plutôt acidophiles - leur optimum de croissance avoisine en général un pH de 5,5-6,0 (Gueguen & Schmidt, 1992) - et se développent lentement. Les transformations résultant de leur activité auront dès lors cours en fin de fermentation. Celles-ci sont surtout développées par une prolongation de la fermentation à une température d'incubation plus basse. Les levures sont en effet moins thermophiles que les bactéries lactiques.

1.2.2 Procédés de fabrication

Qualité du lait

Originellement, le kéfir était préparé à partir de lait de vache, de chèvre ou de brebis (Kosikowski, 1982). Il est aujourd'hui généralement préparé à partir de lait de vache.

Les grains de kéfir sont également capables de fermenter des matrices végétales dont du jus de soya (Abraham & De Antoni, 1999) mais le produit obtenu n'est alors plus du kéfir au sens premier du terme.

Le lait est utilisé entier ou écrémé selon le goût ou la nécessité diététique. Un lait entier donnera un kéfir plus épais et onctueux qu'un lait écrémé (Lacrosse, 1981). Son odeur et sa flaveur seront plus crémeuses et plus douces, moins acides (Muir *et al.*, 1999).

Le traitement thermique du lait joue un rôle important dans la qualité du kéfir. Il a une double fonction : hygiénique et texturante. La chaleur, en dénaturant les protéines du lait et en dispersant les micelles de caséine, améliore en effet la stabilité et la viscosité du caillé et réduit la synérèse (Zourari & Anifantakis, 1988). Le lait est, selon Libudzisz & Piatkiewicz (1990), de préférence pasteurisé à température élevée pendant une période prolongée, par exemple 85-87 °C pendant 10 minutes.

L'homogénéisation du lait améliore également la texture du produit et permet d'éviter une montée de la crème (Zourari & Anifantakis, 1988).

Préparation traditionnelle

Traditionnellement, le lait est fermenté à partir de grains de kéfir. En production domestique, le lait est incubé à température ambiante. La quantité de grains ajoutés au lait et la durée d'incubation sont ajustées en fonction de la température de la pièce et du produit final souhaité : plus ou moins acide, mousseux, visqueux... Chiffrée, cette pratique se traduit par un taux d'ensemencement variant de 2 % à 10 % et une incubation de 18 à 24 heures à une température comprise entre 20 °C et 25 °C (Wszolek *et al.*, 2001). Les grains de kéfir sont alors séparés du lait fermenté à l'aide d'un tamis. Rincés à l'eau, ils peuvent être réutilisés pour d'autres ensemencements.

Le lait fermenté peut ensuite subir une maturation destinée à favoriser le développement et l'activité des levures. Le produit final sera alors plus alcoolisé et pétillant et aura un goût de levure plus prononcé. Dans cette optique, le lait est transvasé dans un récipient hermétique et incubé en cave (8 °C – 10 °C). La durée d'incubation dépend du degré de maturation souhaité. Elle est de minimum 8 à 10 heures et peut durer jusqu'à 24, 36 voire 48 heures (Lacrosse, 1981 ; Wszolek *et al.*, 2001). La maturation est ensuite arrêtée par refroidissement.

Ce procédé simple est matériellement peu pratique à mettre en œuvre pour une production industrielle de kéfir. D'autant plus que, pour la préservation des grains, le matériel ne peut contenir d'alliage métallique (Libudzisz & Piatkiewicz, 1990).

Procédés industriels

En production industrielle, le lait est le plus souvent inoculé avec un levain. La difficulté majeure dans ce type de production est d'obtenir un levain de composition microbienne équivalente à celle du grain ou, tout du moins, conduisant à un produit similaire au kéfir traditionnel.

Préparation du levain

Le levain utilisé dans la méthode russe, décrite par Koroleva (1988), est préparé par fermentation du lait à partir de grains. Cette méthode permet de préserver au mieux la complexité microbienne du ferment original. Toutefois, la balance microbienne du ferment original semble difficile à reproduire. Les conditions de culture sont pour ce point déterminantes. Un ensemencement plus élevé conduit en effet à une balance microbienne plus

pauvre en coques et en levures qu'un ensemencement plus faible. Parallèlement, une température d'incubation élevée (25 °C) favorise le développement des lactobacilles et des bactéries acétiques tandis qu'une température plus basse (18 °C – 20 °C) favorise celui des coques lactiques. Enfin, l'homogénéisation du lait pendant la fermentation a pour effet d'accroître la population des lactocoques et des levures tandis qu'un rinçage hebdomadaire des grains a pour effet de diminuer celle de tous les groupes bactériens.

Les conditions de culture conduisant, selon Koroleva (1988), au développement optimal de tous les groupes microbiens présents dans le grain sont : un ensemencement compris entre 2 % et 3 %, une incubation de 24 heures à 18-20 °C et 2 à 3 agitations pendant la fermentation.

Elles ne sont cependant pas nécessairement le garant d'une balance microbienne équivalente à celle du grain. Dans ces conditions d'ensemencement et d'incubation, du lait fermenté à partir de grains bulgares présente en effet un appauvrissement en lactobacilles et en levures (Simova *et al.*, 2002). Au cours de cette expérimentation, l'agitation pendant la fermentation semble faire défaut. Si l'absence d'agitation peut expliquer l'appauvrissement en levures, ce n'est pas le cas pour les lactobacilles. Cette manipulation n'a en effet pas d'influence sur le développement de ce groupe microbien (Koroleva, 1988).

Dans la pratique, les conditions d'ensemencement et d'incubation pour la préparation du levain sont très variables (Pidoux, 1984). Dans une manufacture roumaine par exemple, le lait estensemencé avec 1 % de grains et incubé pendant 24 heures à 18-20 °C (Lacrosse, 1981).

Pour obtenir de grandes quantités d'inoculant, le levain est parfois multiplié dans du lait. Les conditions d'incubation du lait préconisées par Koroleva (1988) sont les mêmes que précédemment. Cependant, si ces conditions conduisent à un défaut de balance, il sera amplifié dans le levain "de seconde génération". Ainsi, l'appauvrissement en lactobacilles observé dans le lait fermenté à partir de grains bulgares est accentué après une seconde culture (Simova *et al.*, 2002).

Dans la pratique, les conditions appliquées peuvent être très différentes. En Pologne par exemple, le levain "de seconde génération" est obtenu par incubation à 20 °C pendant 20

heures d'un laitensemencé avec 3 % d'une culture-mère, elle-même issue de la fermentation d'un laitensemencé avec 10 % de grains et incubé à 20 °C pendant 24 heures.

Dans les années 80, l'industrie polonaise a commencé à remplacer, dans ce procédé, les grains de kéfir par une culture lyophilisée. Celle-ci est préparée à partir de lait fermenté par des grains de kéfir puis standardisé à 10 % de la flore totale par addition de levures isolées de grains (Libudzisz & Piatkiewicz, 1990).

Enfin, Vayssier (1978) rapporte avoir analysé un levain polonais uniquement constitué de *Streptococcus lactis* et *Streptococcus diacetylactis* (il s'agit probablement de *Lactococcus lactis* et de son biovar *diacetylactis*). Au vu de la pauvreté microbienne de ce levain, on peut supposer qu'il a été reconstitué à partir de cultures pures. Cependant, les kéfirs préparés à partir de ce type de levain présentent des caractéristiques sensorielles différentes du kéfir traditionnel (Muir *et al.*, 1999). Une étude récente portant sur la formulation d'un ferment à partir de cultures isolées de grains de kéfir a montré que, malgré un nombre élevé d'espèces mises en œuvre (7 bactéries et 4 levures) et le soin apporté à leur balance dans le produit fini, le goût du kéfir obtenu de cette façon s'écarte trop de la boisson originelle pour être acceptable (Assadi *et al.*, 2000).

Préparation du kéfir

L'utilisation d'un levain pour la production de kéfir impose une adaptation des conditions de fermentation par rapport à celles utilisées traditionnellement. Les levains provoquent en effet une acidification du lait plus rapide que les grains (Bourounoff, 1933)². Ainsi, dans une manufacture roumaine, le laitensemencé avec 5 % de levain est incubé pendant 24 heures à une température de 10 °C-12 °C seulement (Lacrosse, 1981). En Pologne, la température d'incubation est plus proche de la tradition : elle varie selon les saisons de 19 °C-20 °C en hiver à 21 °C-23 °C en été (Libudzisz & Piatkiewicz, 1990). Le taux d'ensemencement est ajusté pour compenser les variations saisonnières de la température d'incubation : 5 % à 7 % en hiver et 2 % à 3 % en été. L'adaptation porte ici essentiellement sur la durée d'incubation qui est plus courte. Elle est de 6-8 heures ou de 14 heures selon qu'elle est réalisée en tank ou en bouteilles. La fermentation du lait est en effet réalisée en tank ou directement dans les conteneurs destinés à la distribution du produit.

² Bourounoff, 1933. Recherches sur le kéfir. Thèse de l'Ecole vétérinaire de Lyon. Cité par : Pidoux, 1984.

La maturation du lait acidifié, lorsqu'elle est pratiquée, se fait en bouteille, dans les mêmes conditions d'incubation qu'en production traditionnelle.

1.2.3 *Composition du lait fermenté*

La qualité du kéfir, tant au niveau du goût que de sa valeur nutritionnelle ou diététique, dépend de celle du lait et des transformations résultant de l'activité des différents micro-organismes présents dans le ferment. La diversité de la composition microbienne des ferments et des pratiques déterminant leur développement engendre une grande diversité de kéfirs. Les traits communs à ces kéfirs, mais développés avec des intensités variables, sont l'acidification, la présence d'alcool et d'un fond levuré, ainsi qu'une texture onctueuse et mousseuse. Au niveau sensoriel, le kéfir traditionnel est décrit comme étant plus onctueux et plus crémeux mais aussi plus acide et plus amer qu'un yaourt, lait fermenté mieux connu chez nous (Muir *et al.*, 1999).

La qualité du kéfir dépend avant tout de sa composition chimique et c'est dès lors au travers de celle-ci que nous tenterons de la caractériser.

Acides organiques

L'acide lactique du kéfir est presque exclusivement sous la forme de son isomère L(+), forme la plus assimilable par l'organisme humain. Les teneurs en acide lactique communément citées pour le kéfir, et confirmées par les mesures de Lacrosse (1970), sont comprises entre 6 et 10 g.l⁻¹ (Pidoux, 1984 ; Hallé *et al.*, 1994 ; Libudzisz & Piatkiewicz, 1990). Il semblerait cependant qu'elles puissent être beaucoup plus élevées : une teneur de 15 g.l⁻¹ a en effet été mesurée dans un lait fermenté à partir de grains argentins (Assadi *et al.*, 2000). Ces teneurs sont, dans l'ensemble, comparables à celles d'un yaourt. Ce dernier doit en effet avoir une teneur minimale en acide lactique de 7 g.kg⁻¹ (Norme FIL 163, 1992) et si possible comprise entre 10 g.kg⁻¹ et 13 g.kg⁻¹ (Loones, 1994), mais elle peut s'élever jusqu'à 17 g.kg⁻¹ (Muir *et al.*, 1999).

Le kéfir peut contenir des quantités relativement élevées d'acide acétique : 0,9 g.l⁻¹ alors que celle d'un yaourt est de 0,2 g.l⁻¹ (Muir *et al.*, 1999). Ce composé contribue probablement à la perception "acide" du kéfir.

Lactose

La quantité de lactose restant après fermentation varie selon Hallé *et al.* (1994) de 20 g.l⁻¹ et 35 g.l⁻¹. Assadi *et al.* (2000) en mesurent toutefois une quantité moindre dans un kéfir traditionnel : 14 g.l⁻¹.

Malgré la présence de lactose résiduel, le kéfir peut, selon Zourari & Anifantakis (1988), être consommé sans problème par les personnes intolérantes au lactose. A quantités égales, le lactose ingéré par l'intermédiaire de kéfir est effectivement mieux digéré et mieux toléré par l'homme adulte que celui ingéré par la consommation de lait (Hertzler & Clancy, 2003). Cette amélioration de la digestion et de la tolérance au lactose proviendrait de la libération, dans le tube digestif, de β -galactosidase microbienne.

Composés aromatisants

Selon Kosikowski (1982) la flaveur typique du kéfir serait due à la présence de diacétyle et d'acétaldéhyde dans un rapport 3:1. Cependant, la valeur mesurée par Wszolek *et al.* (2001) dans des kéfirs traditionnels préparés à partir de laits d'origines différentes (brebis, chèvre et vache) est en moyenne de 5:4. Elle est, dans ce cas, proche du rapport défini par Lindsay & Day (1965) comme conférant au beurre un défaut de goût dit "de yaourt" : 5:6.

Par ailleurs, il semblerait que les teneurs en diacétyle du kéfir soient parfois trop faibles pour contribuer à sa flaveur. Variant entre 1 mg.l⁻¹ et 2,6 mg.l⁻¹ (Libudzisz & Piatkiewicz, 1990 ; Wszolek *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 2002a) les concentrations en diacétyle mesurées dans des kéfirs traditionnels, sont parfois inférieures aux teneurs minimales nécessaires pour développer la flaveur des produits laitiers fermentés : de 2 à 4 mg.l⁻¹ (Desmazeaud, 1992).

Protéines, matière grasse et acide linoléique conjugué

Les teneurs en protéines, en matière grasse et en acide linoléique conjugué (CLA) du kéfir sont essentiellement déterminées par celles du lait utilisé.

La teneur en protéine du lait reste inchangée après la fermentation lactique (Kuo & Lin, 1999). Du point de vue digestibilité, les protéines du kéfir seraient équivalentes à celles des laits caillés (Pidoux, 1984).

La teneur en matière grasse du kéfir dépend du choix du lait utilisé : entier, demi-écrémé ou écrémé. Elle diminue toutefois après la fermentation lactique. Du kéfir préparé à partir d'un lait à 3,5 % de matière grasse affiche un taux compris entre 3,0 % et 3,1 % (Kuo & Lin, 1999) ; taux qui s'inscrit dans les valeurs citées par Pidoux (1984) : de 3,0 % à 3,2 %.

La teneur du lait en l'isomère t9, t11 du CLA est augmentée après fermentation par des grains de kéfir (Guzel-Seydim *et al.*, 2006). Cette composante isomérique du CLA ne représente toutefois qu'une petite fraction de l'ensemble des isomères du CLA (Khanal, 2004) et ne semble pas modifier la teneur en CLA total du lait qui reste inchangée après fermentation par des grains de kéfir (Ninane *et al.*, 2005b).

Alcool et CO₂

La teneur en éthanol du kéfir dépend du procédé de fabrication appliqué. Elle est plus élevée dans le kéfir traditionnel que dans le kéfir industriel. Un lait acidifié à partir de grains a une teneur en éthanol comprise entre 0,1 % et 0,3 % (Kuo & Lin, 1999). Après maturation, la teneur en éthanol de ce lait acidifié peut atteindre 1 % (Kosikowski, 1982), 2 % (Libudzisz & Piatkiewicz, 1990) ou plus (Koroleva, 1988). La teneur en alcool dans les kéfirs industriels atteint par contre au maximum 0,04 % (Glaeser, 1981)³.

De même que pour la teneur en éthanol, l'enrichissement en CO₂ du kéfir dépend du procédé appliqué. Pour un lait acidifié à partir de grains de kéfir, le taux de CO₂ est, selon Libudzisz & Piatkiewicz (1990), compris entre 0,08 % et 0,2 %. Il peut toutefois être beaucoup plus élevé : 3 % de CO₂ ont été mesurés dans un lait acidifié à partir de grains argentins (Assadi *et al.*, 2000). On peut s'attendre à des taux encore plus élevés après la maturation du lait fermenté : selon Bourounoff (1933)⁴, les bouteilles éclatent parfois après trois jours de maturation. Toujours selon cet auteur, l'utilisation d'un levain fait chuter la teneur en CO₂ au cours des repiquages.

³ Glaeser H., 1981. [Kefir : cultures, production, chemical composition and nutritive value.] *Ernähr. Umsch.*, 28, 156-158 (DSA 1982, n° 6920). Cité par : Zourari & Anifantakis, 1988.

⁴ Bourounoff, 1933. Recherches sur le kéfir. Thèse de l'Ecole vétérinaire de Lyon. Cité par : Pidoux, 1984.

1.3 Perspectives de développement

Les perspectives de développement envisagées par les équipes de chercheurs intéressés par le kéfir couvrent les domaines de la cosmétologie (Chen *et al.*, 2006), de la bioprotection alimentaire (Powell *et al.*, 2006 ; Dimitrellou *et al.*, 2007), du recyclage du petit lait, un sous-produit de l'industrie laitière (Athanasiadis *et al.*, 2001 ; Athanasiadis *et al.*, 2002 ; Koutinas *et al.*, 2007), de la boulangerie (Plessas *et al.*, 2005 ; Esteller *et al.*, 2006 ; Plessas *et al.*, 2007a ; Plessas *et al.*, 2007b ; Filipcev *et al.*, 2007 ; Plessas *et al.*, 2008) et de l'alimentation humaine et animale à caractère "santé". Cette dernière, qui émane de la réputation du kéfir, est de loin la plus documentée.

1.3.1 Réputation du kéfir

Le kéfir véhicule la réputation d'être bénéfique à la santé. Dans les régions de l'Est, cette réputation forgée à partir d'expériences personnelles, bénéficie de l'aval du corps médical. Selon Farnworth (1999), le kéfir est quotidiennement servi à titre "d'activateur de la santé" dans des hôpitaux russes et y est utilisé comme agent thérapeutique pour certaines infections. D'après cet auteur, les textes russes de Batinkov (1971)⁵, Besednova *et al.* (1977)⁶, Bukhgalter (1974)⁷, et Sukhov *et al.* (1986)⁸, font état de l'utilisation curative du kéfir dans le traitement de maladies digestives, de bronchites et de pneumonies.

Les vertus bienfaisantes du kéfir trouvent aussi un écho auprès du corps médical japonais : Ota (1999), un membre du corps académique de l'Ecole de médecine de l'Université d'Osaka (Japon), en préconise la consommation comme mesure préventive d'infection par les

⁵ Batinkov E.L., 1971. [Use of milk and kefir in peptic ulcer of the stomach and duodenum.] *Vopr. Pitan.* **30** (4), 98-91. Cité par : Farnworth, 1999.

⁶ Besednova N.N., Epshtein L.M., Gazha A.K., Borovskaia G.A., Besednov A.L., Rhozhznov I.V. & Smolina T.P., 1997. [Therapeutic-prophylactic milk products with a new immunocorrector of natural origin.] *Vopr. Pitan.* (3), 31-34. Cité par : Farnworth, 1999.

⁷ Bukhgalter F.L., 1974. [Use of kefir in complex treatment of children with biliary tract diseases associated with diseases of the pancreas.] *Pediatr. Akush. Ginekol.* (6), 15-17. Cité par : Farnworth, 1999.

⁸ Sukhov S., Kalamkarova L.I., Il'Chenko L.A. & Zhangabylov A.K., 1986. [Changes in the microflora of the small and large intestine in patients with chronic enteritis after dietary treatment with cultured milk products.] *Vopr. Pitan.* (4), 14-17. Cité par : Farnworth, 1999.

souches entérohémorragiques de *Escherichia coli* O157. L'ingestion de kéfir, en stimulant la colonisation des intestins par des bifidobactéries et des bactéries lactiques, limiterait le développement de *E. coli* O157.

1.3.2 Notions de probiotique et d'aliment fonctionnel

Probiotiques

La notion de probiotique trouve son origine dans les travaux de Metchnikoff, microbiologiste et prix Nobel de médecine au début du XX^{ème} siècle. D'après la synthèse de ses travaux réalisée par Tannock (2002), Metchnikoff associa la longévité des populations de l'Europe de l'Est à une importante consommation de lait fermenté. Il attribua cette longévité au remplacement des bactéries intestinales qu'il qualifiait de "putréfiantes" par les bactéries "acidifiantes" des laits fermentés. Selon Metchnikoff, les bactéries intestinales produisaient en effet des substances toxiques responsables du vieillissement. Dès lors, pour prévenir l'auto-intoxication générée par les bactéries "putréfiantes" de l'intestin, et donc augmenter l'espérance de vie, Metchnikoff proposa d'ingérer des bactéries lactiques vivantes. L'argumentation scientifique de Metchnikoff est aujourd'hui mise en doute d'une part à cause de l'absence de registre d'état civil permettant de vérifier la longévité réelle de ces populations et, d'autre part, par le rôle avéré positif, et non négatif comme le supposait Metchnikoff, de la plupart des micro-organismes de la flore intestinale sur l'hôte (Roué, 1996). Entre-temps, l'idée d'ingérer des micro-organismes pour améliorer la santé de l'hôte à été relayée par d'autres scientifiques qui ont introduit puis précisé la notion de "probiotique".

Le terme probiotique a été introduit par Lilly et Stillwell (1965) pour décrire les substances produites par un micro-organisme qui stimulaient le développement d'autres microorganismes. Depuis, la définition des probiotiques a évolué au gré de l'état des connaissances de leurs mécanismes d'action sur la santé. En 1974, Parker élargit la notion de probiotiques aux microorganismes qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore intestinale, englobant ainsi les microorganismes et les métabolites microbiens produits. Quinze ans plus tard, Fuller (1989) redéfinit les probiotiques comme étant : "*des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant sa balance microbienne intestinale*". Plus récemment, un groupe d'experts européens a proposé d'élargir la définition pour y inclure les micro-organismes ayant des mécanismes d'action indépendants d'une modification de la microflore intestinale

(Salminen *et al.*, 1998). Cette proposition a été adoptée par le groupe de travail mandaté conjointement par l'Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (ONUAA) et par l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) pour faire le point sur la question. Ce groupe d'experts internationaux définit en effet les probiotiques comme étant "*des microorganismes vivants qui, administrés en quantités adéquates, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte*" (Anonyme FAO/WHO, 2001).

Aliments fonctionnels

Le concept d'aliment fonctionnel est né au Japon dans les années 80. A cette époque, l'accroissement des maladies liées à l'alimentation, et en particulier celles de la population vieillissante, conduit le gouvernement japonais à subsidier un programme de recherches visant à identifier les fonctions physiologiques des aliments. La mise en évidence de fonctions biomodulantes intervenant dans le contrôle de l'homéostasie de l'organisme, puis l'identification de composés bioactifs et la détermination des facteurs de santé qu'ils améliorent ont défini une nouvelle catégorie d'aliments identifiée par le terme "aliment fonctionnel". Pour les instances japonaises, l'aliment fonctionnel fait référence à un aliment de consommation courante qui, par la présence de composés bioactifs, a un effet bénéfique sur un aspect spécifique de la santé supérieur à la plupart des aliments conventionnels. Les composés alimentaires, présents naturellement dans l'aliment ou ajoutés, considérés au pays du soleil levant comme fonctionnels ou potentiellement fonctionnels comprennent, entre autres, des fibres alimentaires (inuline), des oligosaccharides, des polyalcools (erythritol, sorbitol, maltitol, lactitol), des acides gras poly-insaturés (EPA, DHA, CLA), des peptides, des protéines, des glycosides, des isoprénoïdes (caroténoïdes dont le lycopène), des vitamines, des alcools (oryzanol, octacosanol), des phénols (polyphénols ou flavonoïdes du thé), des cholines (lécithines de soja et d'œuf), des minéraux et des bactéries lactiques (Shinohara, 1995). Dès 1991, le législateur japonais autorise la distinction commerciale des aliments fonctionnels par le label FOSHU pour "*foods for specified health use*" et en détermine les conditions d'octroi (Shinohara, 1995).

Importé en Europe dans les années 90, le concept d'aliment fonctionnel s'y est développé en prenant, dans l'esprit du public, une signification plus large. Pour le consommateur européen, les aliments fonctionnels représenteraient en effet simplement une alternative "plus saine" à l'alimentation classique (Renard, 2000). Pour les Services fédéraux des affaires scientifiques, techniques et culturelles (SSTC) toutefois, un aliment est considéré

comme fonctionnel "si l'on a pu démontrer qu'il influence positivement, et au-delà de son effet nutritionnel classique, une ou plusieurs fonctions de l'organisme de manière à promouvoir le maintien d'un état de bien-être ou de santé, ou de réduction du risque d'une maladie" (SSTC, 2002).

1.3.3 Contexte réglementaire

Les conditions de mise sur le marché des probiotiques sont définies en fonction de leur application : médicamenteuse, alimentaire ou zootechnique.

Application médicamenteuse

Pour une application médicamenteuse, c'est-à-dire pour prévenir ou guérir des maladies humaines ou animales, les lignes directrices de mise sur le marché européen sont fixées par la Directive 65/65/CEE⁹. Elles sont complétées, pour les médicaments à usage humain, par celles de la Directive 2001/83/CE¹⁰. Ces textes de loi européens sont inscrits dans le droit belge par l'intermédiaire de la Loi du 25 mars 1964 sur les médicaments et par l'Arrêté royal du 14 décembre 2006 relatif aux médicaments à usage humain et vétérinaire.

Un médicament ne peut être commercialisé sans autorisation de mise sur le marché octroyée par le Ministre de la Santé publique ou par son délégué, ou par la Commission européenne, après l'évaluation de sa sécurité, de son efficacité et de sa qualité. Ces paramètres sont déterminés sur base, entre autres, des résultats d'essais pharmaceutiques, précliniques et cliniques. Ce sont des essais coûteux, qui doivent être régulièrement reproduits pour maintenir l'enregistrement du médicament. Ceci explique probablement le petit nombre de probiotiques enregistrés dans la liste des médicaments autorisés en Belgique et publiée au Moniteur Belge ; seuls deux probiotiques y figurent actuellement (septembre 2008) : le Lacteol® et l'Enterol®. Il s'agit de préparations à base de souches de *Lactobacillus acidophilus* et *Saccharomyces boulardii* respectivement (Anonyme Centre belge d'information pharmacothérapeutique, 2008).

⁹ Directive 65/65/CEE du Conseil du 26 janvier 1965, concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives, relatives aux spécialités pharmaceutiques

¹⁰ Directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain

Application alimentaire

Par le fait qu'ils sont "destinés à être ingérés par l'être humain", les probiotiques utilisés comme supplément alimentaire, de même que les aliments fonctionnels, sont considérés comme des denrées alimentaires et sont régis par la législation y attachée. Les probiotiques et les aliments fonctionnels doivent à ce titre répondre aux exigences de sécurité alimentaire fixées par le Règlement (CE) n° 178/2002¹¹. Les aliments et ingrédients alimentaires, dont ceux composés de micro-organismes, pour lesquels la consommation humaine est jusqu'ici restée négligeable dans la Communauté, doivent préalablement satisfaire aux exigences du Règlement (CE) n° 258/97¹². Dans la mesure où le kéfir est un aliment traditionnel consommé dans certains Etats membres, il répond *de facto* aux exigences sécuritaires de ces règlements.

La présentation commerciale des aliments et la publicité qui en est faite doivent respecter certaines règles. La Directive 2000/13/CE¹³ en dicte les principes généraux, inscrits dans la législation belge par l'Arrêté royal du 17 avril 1980 concernant la publicité pour les denrées alimentaires, par la Loi du 14 juillet 1991 sur les pratiques du commerce et sur l'information et la protection du consommateur, par l'Arrêté royal du 8 janvier 1992 concernant l'étiquetage nutritionnel des denrées alimentaires et par l'Arrêté royal du 13 septembre 1999 relatif à l'étiquetage des denrées alimentaires préemballées.

Concernant les règles relatives à l'utilisation d'une allégation de santé dans la publicité pour les denrées alimentaires, il ne peut être fait "*référence à un effet de la denrée alimentaire sur la santé ou sur le métabolisme si la preuve de cette allégation ne peut être fournie*" (AR du 17 avril 1980). Les conditions d'utilisation d'une allégation de santé, ou relative à la réduction d'un risque de maladie, dans la Communauté européenne sont précisées dans le

¹¹ Règlement (CE) n° 178/2002 du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires

¹² Règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 1997 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires

¹³ Directive 2000/13/CE établissant les règles d'étiquetage, de présentation et de publicité des denrées alimentaires

Règlement (CE) n° 1924/2006¹⁴, modifié par les Règlements (CE) n° 107/2008¹⁵ et 109/2008¹⁶. D'application depuis le 1^{er} juillet 2007, toutes les dispositions réglementaires ne sont pas encore effectives en date du 4 juillet 2008. Ce règlement prévoit ainsi la création, au plus tard pour le 31 janvier 2010, d'une liste positive d'allégations de santé autorisées dans laquelle seront définies leurs conditions d'utilisation. Les allégations reprises dans la liste pourront être faites sans autre procédure d'autorisation pour autant qu'elles soient fondées ("*reposent sur des preuves scientifiques généralement admises*") et bien comprises par le consommateur moyen.

Pour d'autres allégations de santé ou pour celles relatives à la réduction d'un risque de maladie, une demande d'autorisation doit être introduite auprès de l'autorité nationale compétente (le Ministre de la Santé publique). L'autorisation sera octroyée après une évaluation scientifique de la pertinence de la demande par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA). A charge du demandeur de fournir à l'EFSA la preuve scientifique que l'allégation répond aux critères définis dans le règlement. Les exigences au niveau de contenu et de la présentation de la demande d'autorisation sont fixées dans le Règlement (CE) n° 353/2008¹⁷. Elles incluent la réalisation d'études sur l'être humain, auxquelles elles donnent la prépondérance.

Application zootechnique

Utilisés pour avoir un effet positif sur la production, le rendement ou le bien-être des animaux, notamment en influençant leur flore gastro-intestinale, les probiotiques sont considérés comme des additifs zootechniques. Leur mise sur le marché européen, leur

¹⁴ Règlement (CE) n° 1924/2006 du Parlement européen et du Conseil du 20 décembre 2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires

¹⁵ Règlement (CE) n° 107/2008 du Parlement européen et du Conseil du 15 janvier 2008 modifiant le règlement (CE) n° 1924/2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires en ce qui concerne les compétences d'exécution conférées à la Commission

¹⁶ Règlement (CE) n° 109/2008 du Parlement européen et du Conseil du 15 janvier 2008 modifiant le règlement (CE) n° 1924/2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires

¹⁷ Règlement 353/2008 de la Commission du 18 avril 2008 fixant les dispositions d'exécution relatives aux demandes d'autorisation d'allégations de santé prévues à l'article 15 du règlement (CE) n° 1924/2006 du Parlement européen et du Conseil

présentation commerciale (étiquetage) et leur utilisation sont réglementées par le Règlement (CE) n° 1831/2003¹⁸. Un additif ne peut être mis sur le marché, transformé ou utilisé pour l'alimentation animale sans autorisation de la Commission, accordée sous la forme d'un règlement publié au Journal officiel de l'Union européenne. La demande est effectuée auprès de la Commission, laquelle en informe les Etats membres et transmet cette demande à l'EFSA pour avis. L'EFSA évalue, entre autres, l'efficacité du probiotique sur base des résultats des études réalisées à cet effet. Le règlement prévoit que l'EFSA publie des lignes directrices détaillées afin d'aider le demandeur à établir et à présenter sa demande. Elles ont été publiées le 28 août 2007 pour les additifs composés ou issus de plantes (plantes, herbes et extraits de plante). Deux documents additionnels pourraient concerner les micro-organismes : un des deux documents, publié le 13 septembre 2007, concerne l'extrapolation des résultats obtenus sur des espèces d'élevage courantes à des espèces d'élevage occasionnelles ou mineures, et l'autre, publié le 12 mars 2008, concerne les tests à conduire pour vérifier la compatibilité entre deux additifs. Ces documents sont disponibles sur le site de l'EFSA : <http://www.efsa.europa.eu>.

Une liste des additifs autorisés pour l'alimentation animale, intitulée Registre communautaire des additifs pour l'alimentation animale, est publiée par la Direction Générale santé et protection des consommateurs (DG SANCO) de la Commission européenne. Plusieurs souches de *Bacillus subtilis*, de *Enterococcus faecium*, de *Lactobacillus acidophilus*, de *Saccharomyces cerevisiae* et une souche de *Bacillus cereus*, de *Bacillus licheniformis*, de *Kluyveromyces marxianus*, de *Lactobacillus rhamnosus* et de *Pediococcus acidilactici* y étaient inscrites au 28 novembre 2007 pour leurs fonctions probiotiques.

1.3.4 Avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir

Pressentie comme source de souches probiotiques, la microflore des grains de kéfir a été utilisée pour en isoler des candidats potentiels. Les potentialités probiotiques des souches isolées de kéfirs ont été évaluées sous l'angle traditionnel de la prévention et du traitement de désordres gastro-intestinaux. Santos *et al.* (2003) ont évalué leur potentiel primaire *in vitro* par l'examen de paramètres impliqués dans deux modes d'action intervenant dans la

¹⁸ Règlement (CE) n° 1831/2003 du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux

régularisation de troubles gastro-intestinaux : l'exclusion compétitive de l'adhérence de pathogènes à la muqueuse intestinale et la production de substances antimicrobiennes. Deux souches isolées de kéfir par ces auteurs montrent une capacité d'adhésion à des cellules coliques humaines et une activité antimicrobienne à l'encontre de plusieurs souches pathogènes. Dans le même ordre d'idées, Golowczyc *et al.* (2007) ont évalué les potentialités de souches de *Lactobacillus kefir* isolées de grains de kéfir à prévenir l'adhésion et l'invasion de cellules coliques humaines par une souche de *Salmonella enterica* et en ont étudié le mode d'action. Contrairement à l'effet attendu d'une action par exclusion compétitive, l'adhésion de *Lb. kefir* aux cellules épithéliales ne prévient pas celle de *S. enterica* et ne réduit pas l'invasion des cellules par le pathogène. Par contre, cultivées avec *S. enterica* avant l'infection, les souches de *Lb. kefir* capables d'agrégation avec ce pathogène en réduisent la capacité d'invasion. Ces auteurs rapportent aussi que les protéines de surface des souches de *Lb. kefir* réduisent les capacités d'adhésion et d'invasion de cette souche de *S. enterica*, indépendamment de leurs propriétés d'agrégation avec le pathogène. Golowczyc *et al.* (2008) ont par ailleurs isolé de grains de kéfir des souches de *Lb. plantarum* qui ont un pouvoir inhibiteur à l'encontre de diverses souches pathogènes ou potentiellement pathogènes. Les souches isolées par Santos *et al.* (2003) ainsi que celles de *Lb. plantarum* isolées par Golowczyc *et al.* (2008) présentent une résistance à l'acidité et à la bile qui laisse entrevoir la possibilité d'une survivance lors du passage dans le tractus gastro-intestinal. Leur survivance et l'efficacité de leur activité probiotique *in vivo* n'ont toutefois pas été éprouvées.

C'est pour une application zootechnique que les propriétés probiotiques du kéfir, au sens d'une modification de la microflore de l'hôte, ont été éprouvées *in vivo*. Dans cet usage, l'intérêt réside surtout dans l'amélioration de l'hygiène des carcasses des animaux. En diminuant la charge fécale en bactéries contaminantes et en pathogènes alimentaires, on diminue le risque de contamination de la carcasse à l'abattage. Dans cette optique, des effets positifs de l'administration de kéfir à de la volaille ont été observés. Ils concernent une exclusion compétitive à l'encontre de *Campylobacter jejuni* chez des poulets (Zacconi *et al.*, 2003) et plus généralement une modification de la microflore fécale d'oisons (Yaman *et al.*, 2006).

Concernant les propriétés de santé à finalité humaine, l'aspect le plus étudié est relatif à l'effet anticarcinogène du kéfir ou de ses fractions (petit lait, matière grasse, polysaccharide...). Shiomi *et al.* (1982) ont observé que l'administration orale d'un

polysaccharide soluble isolé de grains de kéfir, vraisemblablement du kéfirane, inhibe la croissance de tumeurs induites chez des souris. L'effet observé à l'encontre de ce type de tumeur a été réitéré sur des souris avec la prise orale de kéfir ou de jus de soja fermenté par des grains de kéfir (Liu *et al.*, 2002b). Chen *et al.* (2007) ont par ailleurs observé que du petit lait de kéfir, ajouté à des cultures de cellules d'origine humaine, réduit la prolifération des cellules mammaires cancéreuses tout en ne modifiant pas la prolifération des cellules épithéliales saines. Dans cette expérimentation, le petit lait de kéfir a un pouvoir anticarcinogène sur les cellules mammaires supérieur à celui du yaourt : il agit sur la prolifération des cellules cancéreuses à plus faibles doses et de façon plus intense.

Parallèlement à l'effet inhibiteur sur les tumeurs des souris, Shiomi *et al.* (1982) ont constaté que le polysaccharide soluble extrait du kéfir est dépourvu d'effet cytotoxique direct sur les cellules cancéreuses et en ont déduit que son action doit être dirigée par l'intermédiaire de l'hôte. La même équipe a établi une relation entre l'action antitumorale observée et une stimulation de l'immunité à médiation cellulaire (Murofushi *et al.*, 1983). Dans le deuxième cas d'étude oncologique sur des souris, une lyse apoptotique des cellules tumorales et une stimulation de l'immunité humorale dans les tissus intestinaux, induites par l'ingestion de kéfir ou de soja fermenté, ont été rapportées (Liu *et al.*, 2002b). Une stimulation de l'immunité intestinale due à l'ingestion de kéfir traditionnel a été confirmée dans d'autres laboratoires sur de jeunes rats et des souris (Thoreux & Schmucker, 2001 ; Vinderola *et al.*, 2006).

C'est l'aspect préventif des effets anticarcinogènes du kéfir qui a été examiné par Nagira *et al.* (2002) sur différents types de cellules humaines. Ces auteurs ont montré qu'un extrait aqueux de kéfir limite les dommages cellulaires induits par exposition à des rayons ultra-violet. Ils ont mis en évidence un effet de l'extrait de kéfir sur plusieurs facteurs intervenant soit dans la destruction des cellules soit dans leur réparation. Les plus révélateurs sont la diminution rapide des agents oxydants générés et l'accroissement de l'activité d'un système de réparation de l'ADN endommagé. La propriété antioxydante du kéfir a également été montrée en modèle animal. Chez des souris, l'ingestion de kéfir diminue les dommages oxydatifs induits par un agent toxique, le tétrachlorure de carbone (CCl₄), dans les tissus hépatiques et rénaux (Güven *et al.*, 2003). Dans cette expérimentation, le kéfir a un pouvoir antioxydant supérieur à celui, bien connu, de la vitamine E.

Guzel-Seydim *et al.* (2006) ont estimé le potentiel anticarcinogène de la fraction lipidique du kéfir à l'aide d'un test biologique rapide couramment utilisé pour évaluer le potentiel mutagène de composés chimiques (Ames). Dans cet essai, la matière grasse du kéfir, ainsi que celles du lait et du yaourt, diminuent l'effet de certains agents mutagènes sur le révélateur biologique. La matière grasse du kéfir s'y révèle toutefois plus efficace pour diminuer l'effet mutagène de ces agents que la matière grasse du lait et a une action plus large que celle du yaourt : l'effet mutagène de l'azoture de sodium est réduit avec la matière grasse du kéfir mais pas avec celle du yaourt.

La modulation des défenses immunitaires est la finalité visée par l'équipe de Kabayama (1997) dans leur recherche de composés alimentaires anti-stress. Dans cette optique, la fraction lipidique du kéfir et le kéfirane ont des propriétés intéressantes : ils inhibent ou réduisent l'action négative d'hormones de stress sur la production d'interféron β , un facteur humoral non spécifique du système immunitaire, par une lignée de cellules humaines.

Un autre aspect prometteur est celui lié à la réponse de type allergique du système immunitaire. Chez les souris, l'ingestion de kéfir frais ou lyophilisé diminue la réponse immunitaire spécifique à un allergène alimentaire, l'ovalbumine (Umeda *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2006a). L'ingestion de kéfir lyophilisé réduit aussi la réponse inflammatoire de la muqueuse bronchique provoquée par réaction allergique chez la souris. Dans cette expérience, l'ingestion de kéfir diminue le taux d'indicateurs de la réponse immunitaire (IgE et cytokines) et, en parallèle, les manifestations asthmatiques de broncho-constriction et de production de mucus provoquées par la réponse immunitaire à l'allergène (Lee *et al.*, 2007).

Une potentialité hypocholestérolémiant du kéfir a également été étudiée mais les résultats sont controversés. Encourageants au niveau de la capacité d'assimilation de cholestérol par la microflore du kéfir et de l'effet hypocholestérolémiant du kéfir sur des animaux de laboratoire, les résultats ne se vérifient pas en expérimentation humaine. Vujičić *et al.* (1992) ont ainsi mesuré une diminution de la teneur en cholestérol ajouté à du lait après fermentation par des grains de kéfir et, en modèle animal, Liu *et al.* (2006b) rapportent que l'ingestion de kéfir a tendance à réduire le taux de cholestérol sanguin de hamsters nourris avec une alimentation enrichie en cholestérol. Cependant, dans l'expérimentation de St-Onge *et al.* (2002), conduite sur des hommes souffrants d'hypercholestérolémie modérée, le kéfir ne

génère aucune différence du taux de cholestérol sanguin, total ou de ses composantes LDL ou HDL, par rapport à une consommation équivalente de lait.

Le kéfir et le jus de soja fermenté ont par ailleurs des propriétés intéressantes vis-à-vis d'enzymes intervenant dans des mécanismes de régulation physiologique. Certains peptides issus de kéfir préparé avec du lait de chèvre ont ainsi une activité inhibitrice à l'encontre de l'enzyme de conversion de l'angiotensine impliquée dans l'augmentation de la pression artérielle (Quiros *et al.*, 2005). La préservation de leur activité dans des essais de simulation de la digestion gastrointestinale laisse entrevoir une fonctionnalité anti-hypertensive de ces peptides de kéfir. La fermentation de jus de soja par un ferment de kéfir diminue par contre l'activité inhibitrice naturelle du jus de soja à l'encontre de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Kwon *et al.*, 2006). Son action pourrait néanmoins avoir un intérêt vis-à-vis d'un autre aspect de la santé : celui du diabète postprandial. La fermentation du jus de soja par un ferment de kéfir module en effet aussi les activités inhibitrices naturelles du jus de soja à l'encontre d'enzymes intervenant dans le processus à l'origine de l'hyperglycémie postprandiale : l' α -amylase et les α -glucosidases. En réduisant l'activité inhibitrice à l'encontre de l' α -amylase et en augmentant celle à l'encontre des α -glucosidases, la fermentation améliorerait, selon Kwon *et al.* (2006), les potentialités du jus de soja comme alternative thérapeutique à ce type de diabète : elle atténue l'inhibition enzymatique responsable des effets secondaires liés aux thérapies enzymatiques. L'inhibition excessive de l' α -amylase serait en effet responsable de la fermentation intestinale anormale et désagréable des carbohydrates non digérés, associée à la prise médicamenteuse d'inhibiteurs enzymatiques.

Certains aspects santé envisagés relèvent de conséquences thérapeutiques ou d'applications diététiques spécifiques : réduction des effets secondaires de traitements par radiothérapie du cancer sur l'épithélium intestinal ou développement d'un lait fermenté à faible teneur en galactose pour les patients atteints de galactosémie. Ingéré par des rats, le kéfir a un effet protecteur à l'encontre de la destruction apoptotique des cellules intestinales induite par irradiation aux rayons-X (Matsuu *et al.*, 2003). Lié à la dose d'exposition des rats aux rayons-X, l'effet protecteur du kéfir est dans ce cas significatif pour une dose équivalente à la moitié de celle administrée aux patients par séance de radiothérapie. Dans l'optique de proposer aux patients galactosémiques un produit laitier de consommation quotidienne, Varga *et al.* (2006) ont mesuré la capacité d'un ferment de kéfir composé de plusieurs cultures

bactériennes et de levures à diminuer la teneur en galactose de lait à lactose hydrolysé. L'activité fermentaire de ce ferment de kéfir diminue la teneur en galactose du lait à lactose hydrolysé d'un facteur 8 mais le taux de galactose résiduel reste élevé en regard des recommandations médicales pour les jeunes patients galactosémiques.

1.4 Méthodes d'identification des bactéries lactiques

Les bactéries sont classées en groupes taxonomiques, ou taxons, en fonction de critères qui évoluent selon les données disponibles. L'espèce, qui est le groupe de base dans les classements bactériens, est un concept évolutif non encore arrêté par une définition universellement admise.

1.4.1 Notion d'espèce bactérienne

La reproduction sexuée, qui est à la base de la définition de l'espèce dans les règnes animal et végétal, est rare chez les bactéries ; seuls quelques groupes, dont les coliformes, sont capables de conjugaison. Par sa rareté, le critère de reproduction sexuée s'est rapidement révélé inadéquat pour rendre compte de la diversité microbienne impliquée dans les applications pratiques de la microbiologie. C'est en conséquence en fonction de caractéristiques liées à ces applications - phénotypiques (réactions biochimiques), morphologiques et de pathogénicité - et de la source d'isolement que les premiers classements bactériens ont été effectués. L'espèce se définit alors *de facto* comme un ensemble de micro-organismes présentant suffisamment de similarité entre-eux et se différenciant des autres (Staley & Krieg, 1984).

Jusque dans les années 1960, la classification bactérienne reposait sur un petit nombre de critères dont le choix était souvent orienté par les connaissances et présomptions du microbiologiste qui décrivait l'espèce. La prise en compte d'un ensemble plus large de caractéristiques morphologiques et biochimiques pour caractériser les espèces est introduite dans ces années-là. Dix ans plus tard, l'informatisation améliore la validité de cette classification en autorisant le traitement d'un plus grand nombre de tests biochimiques (100-200) et le calcul de coefficients de similarité entre les espèces et leurs composantes microbiennes. Elle ne permet toutefois pas d'objectiver la définition de l'espèce par un seuil de similarité phénotypique (Brenner *et al.*, 2005).

Parallèlement, le développement d'outils permettant de comparer le génome des bactéries introduit un nouveau critère de classification : la similitude de leurs ADNs. Techniquement, le génome bactérien peut aujourd'hui être comparé au niveau de sa composition nucléotidique (pourcentage en cytosine et en guanine), par le biais de sa capacité d'hybridation, par l'intermédiaire de l'empreinte révélée par une méthode déterminée et au niveau de la séquence nucléotidique de gènes particuliers dont celui codant pour l'ARN ribosomique 16S (Vandamme *et al.*, 1996 ; Gillis *et al.*, 2005).

Deux paramètres génotypiques fournissent à la classification bactérienne des critères de spéciation objectifs, considérés comme la référence en matière de définition de l'espèce par les comités d'experts internationaux en systématique bactérienne (Wayne *et al.*, 1987 ; Stackebrandt *et al.*, 2002) : le taux d'hybridation de l'ADN dénaturé (simple brin) provenant de deux bactéries et la stabilité thermique de l'ADN hybride (double brin) formé. Le taux d'hybridation et la valeur du paramètre de stabilité thermique déterminant l'espèce ont été fixés en fonction de la classification existante ; ce sont, comme le précise Stackebrandt (2003), des "*valeur(s) artificielle(s) utilisée(s) pour structurer le monde bactérien de façon cohérente*".

La séquence de l'ADNr 16S fournit une assise plus "naturelle" à la classification bactérienne dans le sens où elle intègre une composante relative à la phylogénie bactérienne. L'ARN ribosomique 16S, parce qu'il a un rôle clé dans la traduction des ARNs messagers en protéines, est présent dans tous les micro-organismes et offre une structure mosaïque incluant des régions conservées et des régions variables, reflets d'événements de mutation plus ou moins lointains liés à leur spéciation (Woese, 1987). Cet outil taxonomique est reconnu et utilisé en systématique bactérienne : la dernière édition (2005) du Bergey's manual of systematic bacteriology, qui est un ouvrage de référence en matière de classification bactérienne, est structurée sur base des relations phylogénétiques établies à partir du gène codant pour l'ADNr 16S. Cependant, le taux d'homologie de l'ADNr 16S des bactéries n'est pas toujours corrélé avec le taux d'hybridation de l'entièreté de l'ADN génomique (Stackebrandt & Goebel, 1994 ; Stackebrandt & Ebers, 2006) et ne peut dès lors se substituer à ce critère décisif dans la définition de l'espèce proposée par les comités d'experts précités.

Si le taux d'hybridation de l'ADN dénaturé provenant de deux bactéries et la stabilité thermique de l'ADN hybride formé constituent la référence en matière de définition de

l'espèce, ils ne suffisent pas à eux seuls pour la déterminer. Pour être reconnue comme telle, une espèce doit aussi pouvoir se distinguer des autres par des caractères phénotypiques (Wayne *et al.*, 1987 ; Stackebrandt *et al.*, 2002). Les critères phénotypiques utilisés en taxonomie polyphasique pour distinguer les espèces bactériennes entre-elles concernent, notamment, des caractères visibles d'ordre morphologique, physiologique, enzymatique et/ou sérologique, des marqueurs chimiotaxonomiques (exopolysaccharides, peptidoglycane, quinones, lipides polaires, acides mycoliques...) et le comportement électrophorétique des protéines cellulaires ou membranaires (Vandamme *et al.*, 1996 ; Gillis *et al.*, 2005). La pertinence des critères varie selon le groupe microbien considéré : la capacité à fermenter différents sucres est un critère pertinent pour différencier les espèces lactiques mais n'a pas de sens pour différencier des *Campylobacter* sp. (elles sont incapables d'utiliser les sucres) par exemple.

La définition de l'espèce proposée par les comités d'experts précités rend peu compte du rôle écologique des bactéries ; si bien qu'elle reconnaît des exceptions à la règle, notamment dans le domaine sensible de la microbiologie médicale (Stackebrandt *et al.*, 2002). Ainsi, *Yersinia pestis* (agent de la peste) et *Y. pseudotuberculosis*, appartiennent, par rapport à cette définition, à la même espèce mais sont nommées distinctement pour éviter une confusion au niveau de la pathogénicité (Brenner *et al.*, 2005).

Pour pallier cette carence, Cohan & Perry (2007) proposent d'asseoir une définition de l'espèce bactérienne sur un concept de cohésion génomique à l'image de celui ordonnant les règnes animal et végétal. Les niches écologiques spécifiques joueraient dans le monde bactérien le rôle sélectif que l'impossibilité de se reproduire opère dans les règnes animal et végétal. Partant de ce postulat, les membres d'une communauté bactérienne ayant des rôles écologiques distincts, ou "écotypes", sont identifiés au travers de la fonctionnalité d'un groupe de gènes (codant pour des protéines). L'équipe de Cohan propose différents modèles d'évolution bactérienne, dont un disponible sur Internet¹⁹ (Koeppel *et al.*, 2008), permettant d'identifier les écotypes d'une communauté bactérienne. Ces modèles sont toutefois contestés par Achtman & Wagner (2008) qui prônent une définition plus large de l'espèce, indépendante d'une méthode d'analyse et d'un critère universel.

¹⁹ <http://fcohan.web.wesleyan.edu/ecosim/>

1.4.2 Identification microbienne

L'identification est le procédé par lequel l'appartenance d'un isolat à l'un ou l'autre taxon est déterminée. Elle repose sur un ensemble de caractéristiques que tous les membres du taxon possèdent et que les autres taxons ne possèdent pas (Krieg, 2005).

1.4.3 Méthodes phénotypiques

Par bactéries lactiques on entend communément des bactéries anaérobies aérotolérantes dont le, ou un des, produit(s) du métabolisme fermentaire est de l'acide lactique. Elles sont Gram positives, catalase négatives, généralement non mobiles et non sporulées (Dellaglio *et al.*, 1994 ; Wood, 1995).

Les caractéristiques phénotypiques répertoriées par Curk *et al.* (1994a) pour les identifier comprennent la morphologie cellulaire, la production d'exopolysaccharide ou de pigment, la température et le pH optimaux de croissance, la tolérance au NaCl, à la bile ou à d'autres inhibiteurs, le type fermentaire (déterminé par la production de CO₂ en milieu glucosé), l'isomère optique de l'acide lactique produit par fermentation du glucose, l'hydrolyse de l'arginine, de l'hippurate, de l'esculine, de l'amidon et de l'urée, et le profil de fermentation des sucres.

Biomérieux (Marcy-l'Etoile, France) commercialise depuis les années 70 un ensemble de tests biochimiques miniaturisés spécifiquement destiné à l'identification des bactéries lactiques (galerie API 50 CHL). L'interprétation de l'ensemble de ces résultats est assistée par une grille d'identification disponible sous forme de document papier ou informatisé. Cet outil d'identification n'est toutefois pas toujours fiable au niveau taxonomique de l'espèce, ni même au niveau du genre : appliqué seul à l'identification de souches bactériennes commerciales il a conduit dans 8 cas sur 27 à une spécification erronée (Huys *et al.*, 2006).

Les méthodes phénotypiques ne permettent par ailleurs pas de différencier toutes les bactéries lactiques : celles autrefois associées à *Lactobacillus acidophilus*, ou encore *Lb. brevis* et *Lb. kefir*, sont indiscernables sur une base phénotypique (Kandler & Kunath, 1983 ; Hammes & Vogel, 1995).

1.4.4 Méthodes physico-chimiques

Les méthodes physico-chimiques appliquées, ou qui offrent des perspectives d'application, aux bactéries lactiques reposent sur l'analyse de composants cellulaires particuliers, les protéines, ou de l'ensemble des composants cellulaires.

Profils protéiques

Une cellule bactérienne synthétise environ 2000 protéines différentes qui fournissent une source riche d'information pour sa caractérisation et son identification. La séparation du mélange de protéines cellulaires par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE), avec ou sans dodécyl sulfate de sodium (SDS), produit un électrophorégramme ou profil protéique complexe qui peut être considéré comme l'empreinte de la souche bactérienne examinée (Curk *et al.*, 1994a). Les profils protéiques peuvent être digitalisés et ainsi comparés sur une base numérique objective. Avec une méthode SDS-PAGE strictement normalisée, l'équipe de l'Université de Gand (Belgique) et ses collaborateurs discriminent fiablement les bactéries lactiques aux niveaux de l'espèce et de la sous-espèce (Vandamme *et al.*, 1996).

La digitalisation des profils protéiques permet de les conserver pour constituer des banques de données de référence. L'identification de souches bactériennes par comparaison avec les données conservées implique une normalisation des profils protéiques qui, apparemment, n'est pas universelle : les différents groupes de recherche travaillent avec leur propre banque de données (Leisner *et al.*, 1999 ; Sánchez *et al.*, 2003 ; Tae-Woon *et al.*, 2003).

Spectres infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les propriétés d'absorption des cellules bactériennes entières dans le moyen infra-rouge (500 à 4000 cm^{-1}) fournissent des spectres IRTF spécifiques à chaque souche et reproductibles (Naumann *et al.*, 1988). Il s'agit d'une méthode rapide qui requiert peu de préparation : la préparation de l'échantillon se résume à l'étalement et la dessiccation d'une culture cellulaire sur un support adéquat (Curk *et al.*, 1994a).

Le spectre IRTF d'une bactérie est fonction de sa composition cellulaire et dépend dès lors, notamment, des conditions de culture. Dans des conditions normalisées de culture, de préparation de l'échantillon et de prise spectrale, les spectres IRTF permettent de discriminer les bactéries lactiques testées au niveau du genre et de l'espèce (Curk *et al.*, 1994b ; Amiel *et*

al., 2000 ; Dziuba *et al.*, 2007). Ces performances taxonomiques ont été établies à partir de souches de collection appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Weissella*.

1.4.5 Méthodes génotypiques

Les méthodes génotypiques d'identification reposent sur les similitudes de l'ADN, total ou de gènes ciblés, de deux souches. Un atout majeur de ces méthodes est l'indépendance du résultat vis-à-vis des conditions de culture.

Hybridation ADN-ADN et stabilité thermique des hybrides

Le taux d'hybridation de l'ADN total de deux souches et la stabilité thermique de l'hybride formé sont des paramètres de référence en matière de définition de l'espèce.

Plusieurs méthodes permettent de les déterminer. Les plus communes selon Vandamme *et al.* (1996) sont la méthode à l'hydroxyapatite (Brenner *et al.*, 1969), la méthode spectrophotométrique (De Ley *et al.*, 1970) et la méthode basée sur une digestion de l'ADN à la nucléase S1 décrite par Crosa *et al.* (1973) puis améliorée par Grimont *et al.* (1980). La méthode spectrophotométrique présente l'avantage, par rapport aux deux autres, d'être affranchie de radio-isotope mais ne permet pas de déterminer le paramètre de stabilité thermique de l'ADN hybride. Ces méthodes classiques requièrent toutes de grandes quantités d'ADN et sont fastidieuses à mettre en oeuvre.

Des méthodes miniaturisées, plus rapides, ont été développées (Ezaki *et al.*, 1989 ; Christensen *et al.*, 2000 ; Mehlen *et al.*, 2004). Comparées aux méthodes classiques, elles conduisent à une bonne corrélation des résultats pour les souches testées. Celles-ci comprennent toutefois peu de bactéries lactiques : seuls à ma connaissance les genres *Bacillus* (Goris *et al.*, 1998) et *Pediococcus* (Mehlen *et al.*, 2004) ont été représentés dans les tests de validation.

Séquençage de l'ADNr

La comparaison de la séquence nucléotidique de gènes discriminants est une technique d'identification bactérienne dont le succès a été promu par le développement d'outils analytiques performants.

Le séquençage de gènes est en effet aujourd'hui une technique partiellement automatisée, permettant de lire rapidement des séquences relativement longues par rapport à celles autorisées par la traditionnelle méthode de Sanger. Les instruments modernes de séquençage automatique de l'ADN sont capables de lire simultanément jusqu'à 384 échantillons d'environ 700 bases en moins de 2 heures (Wiebe *et al.*, 2003).

Parallèlement à cette évolution technologique, différentes organisations ou universités ont constitué des banques de séquences, incluant celles de souches connues, qu'elles mettent à la disposition du public par le réseau Internet. Celle du Genbank²⁰ ou de l'European Molecular Biology Laboratory²¹ (EMBL), sont générales, c'est-à-dire comprennent des séquences de tous les gènes, tandis que celles émanant du Ribosomal Database Project II²² (RDP) géré par l'Université du Michigan (USA) et de l'European Ribosomal RNA Database²³ géré par l'Université de Gand (Belgique) compilent exclusivement les séquences de l'ARN ou de l'ADN ribosomique. La banque émanant du RDP comprend actuellement 513.272 séquences (Anonyme RDP, 2008) tandis que celle de l'European Ribosomal RNA Database en comprenait 20.000 en 2004 (Wuyts *et al.*, 2004).

Elles mettent par ailleurs à la disposition du public des outils informatiques facilitant la comparaison des séquences et permettant de rechercher les séquences les plus similaires à celle de la souche à identifier au sein d'une banque de données. Ces outils sont accessibles par le réseau Internet et fournissent immédiatement le résultat de la recherche. Le logiciel FASTA par exemple de l'European Bioinformatics Institute²⁴ (EMBL-EBI) recherche au sein de la banque de l'EMBL les séquences les plus proches de celle introduite et affiche l'alignement de chacune de ces séquences proches avec celle introduite ainsi que divers paramètres relatifs au taux d'homologie entre les séquences. Les logiciels Seqmatch et Classifier du Ribosomal Database Project II (RDP) fonctionnent de façon similaire mais ne fournissent que le résultat final de la recherche comparative, c'est-à-dire l'attribution de la séquence à identifier à un

²⁰ Genbank : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

²¹ European Molecular Biology Laboratory : <http://www.ebi.ac.uk/embl/>

²² Ribosomal Database Project II : <http://rdp.cme.msu.edu>

²³ European Ribosomal RNA Database : <http://www.psb.ugent.be/rRNA/index.html>

²⁴ European Bioinformatics Institute : <http://www.ebi.ac.uk/>

taxon, sans accès au détail des alignements, amputant ainsi la possibilité d'effectuer une analyse critique du résultat.

Parmi les gènes utilisés à des fins d'identification bactériennes, celui codant pour l'ARN ribosomique 16S présente l'avantage d'être à la base des relations phylogénétiques qui servent d'épine dorsale à la taxonomie contemporaine. Il n'existe toutefois pas de seuil universel d'homologie entre deux séquences de l'ADNr 16S permettant d'affirmer l'identification de la souche bactérienne. Au-delà de ~ 99 % d'homologie, les séquences peuvent aussi bien provenir de souches appartenant à la même espèce que de souches appartenant à des espèces distinctes (Stackebrandt & Ebers, 2006).

Typage moléculaire

De nombreuses méthodes permettant de typiser des bactéries à partir de leur ADN ont été décrites. Les bactéries inconnues sont dans ces cas identifiées par comparaison de leur empreinte, ou profil produit par la méthode appliquée, avec celles de bactéries identifiées.

Les méthodes de typage moléculaire de première génération reposent sur l'analyse des profils obtenus par migration en gel d'agarose de l'ADN digéré (fragmenté) par des enzymes déterminées (RFLP). Sous un champ électrique (électrophorèse), les fragments d'ADN migrent dans le gel à des vitesses inversement proportionnelles à leur longueur et se séparent pour donner, après une durée déterminée, un profil de bandes typique du set de fragments.

Les profils RFLP peuvent être établis à partir de l'entièreté de l'ADN génomique, à partir d'une partie ciblée de l'ADN génomique, gènes codant pour des protéines ou pour l'ARN ribosomique (ARDRA) par exemple, ou, pour les souches dotées de plasmides stables, à partir d'ADN plasmidique. Dans tous les cas, la qualité de l'ADN soumis à la restriction enzymatique est un facteur déterminant et son acquisition peut se révéler fastidieuse quand il s'agit de l'entièreté de l'ADN génomique.

Appliquée à l'entièreté de l'ADN génomique, cette technique présente l'inconvénient additionnel de générer des profils complexes difficiles à interpréter. Le nombre de fragments et la complexité des profils, peuvent être limités par l'emploi d'enzymes de restriction agissant en des sites rares. La longueur des fragments obtenus impose alors de les séparer par électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Une alternative appliquée aux bactéries lactiques, par

Chagnaud *et al.* (2001) notamment, est la mise en évidence des fragments provenant d'un gène ou d'un ensemble de gènes particulier comme l'ADNr (Ribotyping) à l'aide de sondes marquées. Cette option impose alors de transférer le profil obtenu en gel sur une membrane synthétique pour pouvoir hybrider la sonde avec l'ADN cible.

Les méthodes RFLP peuvent se révéler très discriminantes : mises en oeuvre à partir de l'entièreté de l'ADN génomique en utilisant des enzymes de restriction en sites rares (PFGE) ou à partir de gènes codant pour des protéines, elles permettent de différencier les bactéries lactiques auxquelles elles ont été appliquées au niveau de la souche (Zhang & Holley, 1999 ; Giraffa *et al.*, 2003 ; Cai *et al.*, 2007 ; Oguntoyinbo, 2007).

Les méthodes de typage moléculaire plus récentes reposent sur la technique d'amplification génique, ou Polymerase chain reaction (PCR). La PCR est une technique de réplification de l'ADN compris entre deux séquences déterminées par les amorces (oligonucléotidiques) de la réaction en chaîne.

Certaines méthodes consistent en l'amplification de fragments d'ADN génomique déterminés par des amorces non spécifiques, arbitraires (AP, RAPD ou DAF), ou par des séquences consensus répétitives (rep-PCR). Les fragments générés, de longueur variable, sont séparés par migration électrophorétique dans un gel (d'agarose ou de polyacrylamide) et forment une empreinte typique du taxon ou de la bactérie. L'identification de bactéries lactiques au niveau de l'espèce et de la sous-espèce ainsi que la différenciation de souches lactiques par ce type de méthodes ont été rapportées (Cusick & O'Sullivan, 2000 ; De Urraza *et al.*, 2000 ; Masco *et al.*, 2003).

D'autres méthodes consistent en l'amplification d'une région déterminée de l'ADN génomique dont le polymorphisme nucléotidique est révélé en exploitant les propriétés de dissociation de l'ADN. La dissociation de l'ADN, provoquée par une augmentation de la température ou par un agent chimique, transforme le fragment en une structure partiellement ouverte et crée une diminution brutale de sa mobilité électrophorétique dans le gel. Dans un gel soumis à un gradient de température (TTGE) ou incluant un gradient d'agent dénaturant (DGGE), l'ADN se concentre en une position déterminée par la séquence du fragment amplifié. L'avantage de ces méthodes est leur applicabilité à un consortium microbien : les micro-organismes sont caractérisés par une bande spécifique identifiable dans le profil généré par l'ensemble. Avec les régions variables de l'ADNr 16S comme cibles d'amplification

génique, les méthodes TTGE et DGGE se sont révélées performantes pour identifier les bactéries lactiques de divers produits laitiers - fromages, laits fermentés et kéfirs - au niveau taxonomique de l'espèce (Ogier *et al.*, 2002 ; Fasoli *et al.*, 2003 ; Temmerman *et al.*, 2003 ; Ogier *et al.*, 2004 ; Garbers *et al.*, 2004 ; Theunissen *et al.*, 2005).

Hybridation spécifique

D'autres méthodes reposent sur l'hybridation d'une courte séquence nucléotidique de synthèse, spécifique au taxon à identifier ou à détecter, avec la séquence complémentaire de l'ADN de la souche à identifier. Le succès de l'hybridation est révélé par un marqueur lié à la séquence de synthèse, alors appelée sonde, ou par la technique de PCR. Dans ce deuxième cas, deux amorces (séquences nucléotidiques de synthèse) sont nécessaires ; seule une des deux amorces doit être spécifique au taxon ciblé.

Des sondes et des amorces spécifiques à certaines bactéries lactiques ont été décrites et répertoriées respectivement par Coeuret *et al.* (2003) et par Temmerman *et al.* (2004).

1.5 Objectifs du travail

Le kéfir est un lait fermenté traditionnel des pays de l'Est qui se singularise notamment par la forme de son ferment originel. Figés dans une matrice polysaccharidique, les micro-organismes du ferment de kéfir forment en effet de petites masses élastiques compactes, appelées grains de kéfir, qui se multiplient en conservant leurs propriétés.

Les grains de kéfir sont constitués d'une microflore complexe, composée de bactéries lactiques et de levures, souvent associées à des bactéries acétiques, et peuvent être contaminés par des micro-organismes indésirables tels que des bacilles, des microcoques ou des coliformes. Leur composition microbienne varie selon l'origine du grain dans une diversité qui inclut de nombreuses espèces : la littérature mentionne pas moins de 18 espèces différentes pour les seules bactéries lactiques.

L'objectif pratique de ce travail était de caractériser la microflore d'un grain de kéfir choisi parmi la collection du Département (CRA-W, Gembloux, Belgique) pour ses qualités organoleptiques et technologiques supérieures. Par qualités organoleptiques et technologiques on entend les caractéristiques organoleptiques et technologiques considérées et ressenties comme positives par un consommateur belge ordinaire peu familiarisé à ce produit. Le grain

sélectionné procurait ainsi le kéfir le plus apprécié du personnel et ne conduisait pas à un développement gazeux lors de la conservation du produit. L'étude du consortium microbien du grain avait pour finalité la connaissance de sa composition dans un but concret de distribution publique. La caractérisation comprenait dès lors l'évaluation de la qualité hygiénique du grain, l'identification et la quantification des groupes microbiens présents dans le grain, la description de la croissance des principaux groupes microbiens dans des conditions de manutention déterminées, l'identification des espèces microbiennes participant au consortium et l'évaluation de l'intégralité de la diversité microbienne identifiée.

Parmi les groupes microbiens constituant la flore banale des grains de kéfir, les bactéries lactiques sont impliquées dans le plus large éventail de fonctionnalités tant au niveau de la transformation du lait (acidifiante, texturante et probiotique notamment) qu'au niveau de la constitution du grain et revêtent à ce titre une importance majeure. La compréhension précise de leurs rôles au sein de ce ferment particulier qu'est le grain de kéfir repose avant tout sur la justesse de leur identification.

La microflore lactique des grains de kéfir est traditionnellement identifiée par l'analyse des caractéristiques morphologiques et biochimiques des micro-organismes préalablement isolés par culture. Outre l'aspect fastidieux du travail qu'elle demande, cette approche compromet la qualité des résultats à deux niveaux : la fiabilité de l'identification et la diversité des espèces mises à jour. Les bactéries lactiques ne peuvent, dans les cas extrêmes, simplement pas être différenciées sur une seule base phénotypique - c'est le cas notamment des espèces autrefois associées à *Lactobacillus acidophilus* (Hammes & Vogel, 1995) – et leur isolement se heurte à l'incapacité de certaines à se développer sur les milieux de synthèse usuels ; la sélection des milieux de culture est un exercice délicat dont l'insuccès a été constaté dans le contexte du kéfir (Witthuhn *et al.*, 2004). L'objectif méthodologique du travail était de développer, pour les bactéries lactiques de grains de kéfir, une stratégie d'identification permettant de contourner ces difficultés. Elle reposait sur la sélection d'outils d'identification pertinents, adaptés à la multiplicité des espèces lactiques du kéfir.

La reconstitution du grain de kéfir KJ à partir des cultures pures qui en ont été isolées serait un moyen élégant de s'assurer de l'identification de toutes les espèces indispensables à la formation et à la fonctionnalité du grain. S'il est clairement relaté que la reconstitution d'un grain de kéfir à partir de cultures individuelles reste un défi, il n'est nulle part fait mention de

la reconstitution d'un grain à partir de l'ensemble de son consortium microbien. *A fortiori*, les conditions expérimentales de reconstitution *in vitro* d'un grain ne sont pas décrites et constituent un obstacle majeur à cet objectif.

La formation *in situ* des grains de kéfir est un événement local dont la situation géographique écartait l'opportunité d'observer le processus pour en identifier les paramètres déterminants. La conception d'essais expérimentaux de reconstitution de grains reposait dès lors exclusivement sur les données bibliographiques disponibles. Innovant en matière de reconstitution *in vitro* de grains de kéfir, ce travail avait pour objectif d'entamer une réflexion expérimentale dans ce domaine. L'aboutissement d'une reconstitution sur base des descriptions de formation *in situ* des grains de kéfir constituait dans ce contexte un élément fondamental à vérifier.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel biologique

2.1.1 Origine et maintenance du grain de kéfir²⁵ KJ

Le grain de kéfir (KJ) provenait de la collection du Centre wallon de Recherches agronomiques (CRA-W, Gembloux, Belgique). Le Centre acquit ce grain en 1998 auprès de particuliers bruxellois. Selon leurs dires, ce grain était transmis en Belgique, de particulier à particulier, depuis de nombreuses années.

Dès son acquisition, le grain de kéfir KJ a été cultivé dans du lait UHT à 22 °C avec un taux d'ensemencement de 20 % réajusté hebdomadairement, un jour fixe de la semaine. Le lait a été renouvelé quotidiennement excepté les samedis et dimanches. A l'occasion du renouvellement du lait, les grains étaient rincés à l'eau stérile et égouttés. Ces manipulations d'entretien des grains se faisaient à température ambiante.

2.1.2 Origine des souches de référence

Les souches types de *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. johnsonii*, *Lb. kefir*, *Lb. parakefir*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc lactis*, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus* et de *Pediococcus acidilactici* ont été acquises auprès du Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (Gand, Belgique) tandis que celles de *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* et *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* ont été acquises auprès de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ ; Braunschweig, Allemagne). La souche DSM 20248 de *Weissella viridescens* provenant de lait pasteurisé a été acquise auprès du DSMZ (Braunschweig, Allemagne).

²⁵ Le terme grain de kéfir au singulier a été assigné à un ensemble de grains de kéfir provenant d'une même source.

2.2 Qualité hygiénique du grain de kéfir KJ

2.2.1 Mesure du pH du grain

Environ 100 g de grains de kéfir ont été prélevés en cours de cycle de fermentation du lait. Le pH des grains rincés à l'eau stérile et égouttés a été mesuré à l'aide d'une électrode au calomel désinfectée à l'alcool. Pour mesurer le pH, l'électrode était placée au centre de la masse de grains. Les grains étaient ensuite remis dans le lait pour poursuivre la fermentation.

2.2.2 Recherche des germes pathogènes et indicateurs de défauts d'hygiène

Les différents germes ont été recherchés, dans le lait fermenté par du grain de kéfir KJ dans les conditions décrites au paragraphe 2.1.1, à l'aide de méthodes normalisées ou validées par l'Organisation internationale de normalisation (ISO, Genève, Suisse), l'Association française de normalisation (AFNOR, La Plaine Saint-Denis, France) ou la Fédération internationale de laiterie (FIL, Bruxelles, Belgique), ou par des méthodes qui en étaient dérivées (Tableau 2.2.1).

Tableau 2.2.1 : Méthodes appliquées pour la recherche des germes pathogènes et indicateurs de défaut d'hygiène.

| Germes ou groupes de germes recherchés | Méthodes |
|--|---|
| <i>Listeria monocytogenes</i> | AFNOR V 08-055 (1997), AFNOR BIO-12/2-06/94 Vidas, AFNOR BIO-12/4-02/95 Accuprobe |
| <i>Salmonella</i> sp. | AFNOR V 08-052 (1993) |
| Staphylocoques à coagulase positive | ISO 6888-1 (1999) |
| Coliformes | FIL 73B:1998, partie 2 |
| Moisissures | Dérivée* FIL 94B:1991 |
| Micro-organismes contaminants | FIL 153:1991 |

* Etalement en surface de prises d'essai de 0,1 ml et identification des moisissures par examen de la morphologie des colonies.

La recherche des staphylocoques à coagulase positive, de *Listeria monocytogenes* et des *Salmonella* sp. a été effectuée en sous-traitance par le laboratoire national de référence Lait et Produits laitiers de l'Instituut voor Landbouw en Visserijonderzoek (Melle, Belgique).

2.3 Identification et quantification des groupes microbiens du grain de kéfir KJ

2.3.1 Identification des groupes microbiens

L'identification des groupes microbiens a été effectuée à partir du lait fermenté par le grain de kéfir KJ, dans les conditions décrites au paragraphe 2.1.1.

Les groupes microbiens présumés ont été isolés par étalement, en boîtes de Petri, de prises d'essai de 0,1 ml de lait fermenté, pur et dilué dans de l'eau de Ringer, sur les milieux de culture gélosés et dans les conditions d'incubation décrites au Tableau 2.3.1.

L'aspect des colonies bien individualisées, c'est-à-dire développées en nombre inférieur à 150 par boîte de Petri, a été observé. Des colonies ont été prélevées et étalées sur lame pour examiner la morphologie des cellules microbiennes sous un grossissement de 1000 X, et, pour les bactéries, leur réaction à la coloration de Gram.

L'activité enzymatique de la catalase des bactéries a été déterminé par le dépôt d'une goutte de H₂O₂ 27 % sur quelques unes des colonies restantes.

La réaction des cellules microbiennes à la coloration de Gram a été testée à l'aide du coffret Color Gram 2 (Biomérieux, France), mis en œuvre selon les prescriptions du fabricant.

2.3.2 Dénombrements des groupes microbiens

Echantillonnage et préparation des dilutions en vue des dénombrements

Les dénombrements ont été effectués à partir d'échantillons de 12 g ± 3 g de grains frais rincés à l'eau stérile. La première dilution a été réalisée en dispersant les grains dans 9 fois leur volume de solution de Ringer diluée au quart, à l'aide d'un Ultra-turrax T25 (IKA®-Labortechnik, Allemagne). Pour les disperser, une vitesse de rotation à vide de 8.000 tours.min⁻¹ a été appliquée pendant 120 s. Les dilutions suivantes ont été réalisées en suivant les recommandations de la Fédération internationale de laiterie (FIL, Bruxelles) reprises dans la norme FIL 122C: 1996.

Méthodes de dénombrement

Les méthodes appliquées pour dénombrer les différents groupes microbiens dérivait de la méthode de comptage des colonies décrite dans la norme FIL 100B: 1991 (FIL,

Bruxelles). Elles s'en écartaient par rapport aux milieux et aux conditions d'incubation utilisés (Tableau 2.3.1).

Tableau 2.3.1 : Conditions de culture appliquées pour l'isolement et l'énumération des groupes microbiens du grain.

| Groupes microbiens présumés | Milieux de culture | Conditions d'incubation |
|------------------------------|---|---------------------------------|
| Lactobacilles | MRS-Agar _{5,4} * (Merck ; Darmstadt, Allemagne) | 3 jours à 37 °C, en anaérobiose |
| Pédiocoques | MRS-Agar (Merck ; Darmstadt, Allemagne) + 0,05 % (p/v) cystéine hydrochloride, 10 mg.L ⁻¹ vancomycine, 0,1 mg.L ⁻¹ novobiocine (Sigma ; St. Louis, USA) | 1 jour à 37 °C, en anaérobiose |
| <i>Weissella viridescens</i> | APT-Agar (Evans & Niven, 1951) + 5 % (p/v) NaCl (VWR BDH Prolabo ; Fontenay sous Bois, France) | 3 jours à 30 °C, en anaérobiose |
| Coques lactiques | M 17-Agar (Merck ; Darmstadt, Allemagne) | 2 jours à 37 °C, en aérobiose |
| Leuconostocs | Milieu de Mayeux (AES ; Bruz, France) | 10 jours à 22 °C, en aérobiose |
| Microcoques | Agar plate-count (PCA) au lait écrémé (Merck ; Darmstadt, Allemagne) + 5 % (p/v) NaCl (VWR BDH Prolabo ; Fontenay sous Bois, France) | 3 jours à 30 °C, en aérobiose |
| Bactéries acétiques | Acetobacter Peroxydans Medium (Anonyme DSMZ, 2001) | 3 jours à 25 °C, en aérobiose |
| Levures | YGC-Agar (Merck ; Darmstadt, Allemagne) | 5 jours à 22 °C, en aérobiose |

*pH ajusté avec de l'acide acétique glacial (ucb, Louvain, Belgique).

Estimation de la précision des méthodes de dénombrement

La précision des méthodes de dénombrement des lactobacilles, des coques lactiques et des levures a été estimée à partir de 7 échantillons de grains de $11,2 \pm 0,6$ g prélevés dans un lot homogène de grains rincés et égouttés.

Traitement des données

Les populations microbiennes n'observant pas une distribution normale, les paramètres statistiques de moyenne et de dispersion des résultats ont été calculés à partir du logarithme en base 10 des valeurs exprimées en unités formant colonies par gramme (ufc.g⁻¹).

Les paramètres statistiques ont ensuite été convertis dans une base décimale en appliquant les équations suivantes :

$$\text{Moyenne géométrique (ufc.g}^{-1}\text{)} = 10^m, \text{ où } m \text{ est la moyenne des valeurs logarithmiques (log ufc.g}^{-1}\text{).}$$

$$\text{Ecart type relatif géométrique (\%)} = (10^{(S)} - 1) \times 100, \text{ où } S \text{ est l'écart type des valeurs logarithmiques.}$$

2.3.3 *Statistiques des essais répétés dans le temps*

Les paramètres statistiques de moyenne et de dispersion de l'ensemble des mesures effectuées hebdomadairement sur les deux cultures individuelles du grain ont été calculés en considérant les résultats individuels comme des variables aléatoires.

La variance associée à chacune des composantes de la dispersion des résultats, les deux cultures individuelles et les semaines, a été déterminée à l'aide de la procédure VCE du logiciel SAS (SAS Institute, 1994).

2.3.4 *Activité β -galactosidase de la microflore du grain*

Trois grains d'environ 4 g ont été cultivés individuellement dans du lait contenant $0,4 \text{ mg.ml}^{-1}$ de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal, Biosolve b.v. ; Valkenswaard, Pays-Bas). Les trois grains ont été mis en culture dans le lait additionné de X-gal avec un taux d'ensemencement de 20 % (p/v). Deux des grains ont été cultivés en parallèle à $22 \text{ }^\circ\text{C}$; une des cultures était maintenue au repos tandis que l'autre était agitée à 140 tours par minute. Le troisième grain a été cultivé indépendamment à température ambiante et sans agitation. Après 24 heures d'incubation les grains ont été rincés à l'eau stérile et photographiés.

Des prélèvements locaux ont été effectués sur le grain cultivé indépendamment des deux autres pour vérifier la présence de bactéries capables d'utiliser le X-gal dans les zones restées inactives, non colorées, du grain.

Les prélèvements, effectués par frottis à l'aide de cure-dents stériles, ont été mis en culture sur du milieu MRS-Agar (Merck ; Darmstadt, Allemagne). Après une incubation de 72 heures à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ et en anaérobiose, des gouttes de X-gal 40 mg.ml^{-1} ont été déposées sur les

colonies. La lecture des boîtes de Petri a été réalisée après une seconde incubation de 24 heures à 37 °C et en anaérobiose.

2.4 Identification moléculaire des bactéries lactiques du grain de kéfir KJ

2.4.1 Comparaison des séquences de l'European Molecular Biology Laboratory

Les séquences de l'European Molecular Biology Laboratory (EMBL) ont été alignées et comparées à l'aide du logiciel "Clustal W" (Thompson *et al.*, 1994) de l'European Bioinformatics Institute (EBI).

2.4.2 Séquences bordant les régions V1, V2 et V3 de l'ADNr 16S

Les régions variables V1, V2 et V3 ont été localisées dans l'ADNr 16S des bactéries lactiques à l'aide de séquences repères déduites des schémas de la structure secondaire de l'ARN 16S de *E. coli* donnés par Neefs *et al.* (1993). Les zones les plus conservées bordant les régions variables ont été localisées sur le schéma illustrant la variabilité des nucléotides et leur séquence nucléotidique a été déterminée à partir du schéma précisant la séquence des différents nucléotides.

Les séquences repères bordant la région variable V1 étaient : 5'-CATGCAAGT-3' et 5'-GGTGAGTAA-3'. La séquence repère 5'-GGTGAGTAA-3' était commune à V1 et à V2 dont elle marquait le début, 5'-ATTAGCTAGTAGGTGGGGT-3' délimitant l'autre extrémité de V2. Les séquences bordant V3 étaient 5'-GTAAA-3' et, environ 65 nucléotides plus loin, 5'-AAG-3'.

La stabilité des nucléotides au sein de ces séquences a été représentée par un trait d'autant plus foncé qu'ils sont plus conservés ; ceux parfaitement conservés dans toutes les espèces analysées par Neefs *et al.* (1993) ont été soulignés par un double trait.

2.4.3 Taux de variabilité des nucléotides

Le taux de variabilité des nucléotides dans une séquence de longueur donnée (N) a été défini comme étant la variabilité moyenne des nucléotides de cette séquence multipliée par 100.

| |
|---|
| $\text{Le taux de variabilité des nucléotides} = \frac{\sum_{n=1}^{n=N} X_n}{N} \times 100$ <p style="text-align: right; margin-right: 20px;">, où X est le nombre de nucléotides différents alignés à la position n, et N est le nombre de nucléotides que comprend la séquence.</p> |
|---|

2.4.4 Stratégie d'isolement et d'identification de l'ADN ciblé

L'isolement de l'ADNr 16S ciblé des micro-organismes du grain de kéfir comprenait plusieurs étapes (Ninane *et al.*, 2006). Elles incluaient une extraction de l'ADN génomique de l'ensemble du consortium microbien d'un grain et l'amplification d'une région ciblée de l'ADNr 16S. Cette étape d'amplification a été mise à profit pour isoler l'ADNr 16S des populations bactériennes minoritaires dans le grain de kéfir KJ en terme d'unités viables : leur ADNr 16S été amplifié séparément de celui des populations bactériennes majoritaires.

Les fragments amplifiés de l'ADNr 16S, issus d'un mélange bactérien, ont ensuite été individualisés par clonage dans *E. coli*.

La séquence des fragments individualisés a été déterminée et leur origine identifiée par comparaison avec les séquences d'une banque de données.

2.4.5 Extraction de l'ADN génomique

Méthode d'extraction

L'ADN du kéfir KJ a été extrait à partir d'un grain de kéfir frais et rincé à l'eau stérile de 50 mg ; l'ADN des souches bactériennes types a été extrait à partir du culot cellulaire produit par 1,5 ml de culture "over-night" à 30 °C ou, pour *Streptococcus thermophilus*, à 37 °C ; l'ADN des isolats de lactobacilles a été extrait à partir d'une colonie directement prélevée sur le milieu de culture gélosé. Le matériel biologique a été immergé, ou mis en suspension pour les cellules bactériennes, dans une solution de lyse fraîchement préparée composée de 100 µl de NaOH 0,1 N et de 1 µl de SDS 10 %. La lyse des cellules a été complétée par une alternance, répétée 3 fois, de chauffage au four à micro-ondes pendant 60 s et de refroidissement sur glace pendant 60 s. L'ADN a ensuite été précipité par ajout de 10 µl de K-acétate 3 M et de 200 µl d'éthanol 96 % froid (-20 °C) au mélange maintenu sur glace. Après 10 minutes, l'ADN a été séparé de la phase liquide par centrifugation et le surnageant

éliminé. Le culot d'ADN, rincé à l'éthanol 70 % et séché à température ambiante, a été suspendu dans 50 µl de Tris HCl 10 mM (pH 7,2).

Rendement de la méthode d'extraction

Le rendement de la méthode d'extraction de l'ADN a été estimé sur les souches types de *Lactobacillus acidophilus*, de *Lb. casei*, de *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* et de *Lb. kefiri*. L'ADN a été extrait à partir de trois culots cellulaires de poids connu par souche. Les extraits d'ADN ont ensuite été déposés en gel d'agarose en quantités inversement proportionnelles aux poids des culots cellulaires. La quantité d'ADN était évaluée par l'intensité du signal révélé sous UV, après migration pendant 36 minutes à 70 V.

2.4.6 Amplification des fragments ciblés d'ADN

L'ADN génomique a été amplifié à l'aide de l'amorce universelle 27F décrite par Rochelle *et al.* (1992), utilisée en combinaison avec une amorce commune aux lactobacilles (R350) ou avec une amorce spécifique aux coques lactiques (*Lactococcus* sp. et *Streptococcus thermophilus*) et aux leuconostocs (R485), selon la population bactérienne ciblée. Les amorces spécifiques à l'un ou l'autre groupe microbien ont été déterminées à l'occasion de cette étude. Leurs séquences ont été enregistrées dans la banque de données de l'EMBL sous les numéros d'accès AM419049 et AM419050 respectivement pour R350 et R385. Les séquences des amorces étaient les suivantes :

R350, 5'-TCCATTGTGGAAGATTCCC-3' (lactobacilles)

R485, 5'-TTAGCCGTCCTTTCTGG-3' (coques lactiques plus leuconostocs).

Les indices (350 et 485) des amorces font référence aux positions du nucléotide terminal de l'extrémité 3' de chacune d'elles sur le gène de l'ARNr 16S de la souche type de *Escherichia coli*, enregistré sous le numéro d'accès X80725 (Cilia *et al.*, 1996).

Les réactions d'amplification ont été effectuées à partir de 2 µl d'ADN auquel le mélange réactionnel a été ajouté de façon à obtenir un volume total de 25 µl. Le mélange réactionnel était composé de Tris-HCl (pH 8,0), de KCl, de MgCl₂ et de chacun des dNTPs à des concentrations finales de 20 mM, 50 mM, 2,5 mM et 0,2 mM respectivement. Il contenait en outre par réaction : 20 pmol de chaque amorce et 1,25 U de Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Merelbeke, Belgique).

L'ADN a été dénaturé, et l'enzyme activée, à une température de 95 °C pendant 120 s. Le fragment d'ADN a été amplifié durant 30 cycles comprenant une phase de dénaturation à 94 °C pendant 15 s, suivie par une phase d'hybridation pendant 60 s et une phase d'élongation à 72 °C pendant 90 s. Pour augmenter la spécificité de l'hybridation, tout en conservant un bon rendement d'amplification, les 10 premiers cycles ont été effectués à une température d'hybridation plus élevée que les 20 cycles suivants. Les températures d'hybridation appliquées à la paire d'amorces ciblant les lactobacilles (27F-R350) étaient de 56 °C et 49 °C respectivement pour les 10 premiers et les 20 cycles suivants. Celles appliquées à la paire d'amorces ciblant les coques lactiques et les leuconostocs (27F-R485) étaient respectivement de 60 °C et 53 °C. Les réactions ont été complétées par une période d'élongation de 7 minutes à 72 °C et, ensuite, arrêtées par refroidissement à 4 °C.

La qualité du produit a été vérifiée par la migration d'un aliquote de 10 µl dans un gel d'agarose 2 %. Sa pureté a été attestée par la présence d'une seule bande d'ADN tandis que sa taille a été estimée par la migration simultanée d'un marqueur de poids moléculaire (100 pb Ladder, Invitrogen, Merelbeke, Belgique).

2.4.7 Clonage des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN ont été insérés dans le plasmide pCR[®]2.1-TOPO et, ensuite, transformés dans la souche TOP10 chimiquement compétente de *E. coli* à l'aide du kit TOPO TA Cloning[®] (Invitrogen, Merelbeke, Belgique).

La taille des inserts a été vérifiée par la migration en gel d'agarose du produit d'amplifications géniques réalisées avec les amorces M13-Forward et M13-Reverse propres au plasmide. L'extraction de l'ADN des clones de *E. coli*, les réactions d'amplifications et l'estimation de la taille des fragments amplifiés ont été effectuées de la même façon que précédemment, excepté pour les cycles de température. Dans ce cas, l'ADN a été amplifié par 30 cycles identiques comprenant une phase de dénaturation à 94 °C pendant 30 s, suivie par une phase d'hybridation à 55 °C pendant 30 s et une phase d'élongation à 72 °C pendant 30 s.

2.4.8 Extraction de l'ADN plasmidique des clones de *Escherichia coli*

L'ADN plasmidique des clones de *E. coli* contenant l'insert à séquencer a été isolé, à partir du culot cellulaire de 5 ml de culture over-night à 37 °C, à l'aide du High Pure Plasmid Isolation Kit distribué par Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Allemagne).

La qualité et la concentration des extraits d'ADN ont été estimées par spectrophotométrie UV à partir d'aliquotes diluées 200 fois. La qualité de l'ADN a été attestée par un rapport des absorbances à 260 nm et à 280 nm proche de 1,8. La concentration a été calculée à partir de l'absorbance à 260 nm (A_{260}), en considérant qu'une concentration en ADN de $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ livre une absorbance $A_{260} = 1$.

2.4.9 Séquençage des inserts

Estimation du nombre de fragments à séquencer

Le nombre de fragments a été calculé à partir de la loi binomiale : $P = 1 - (1-p)^n$ où P est la probabilité de détecter dans "n" séquences, au moins une séquence particulière présente en proportion "p" dans la population totale.

Transformée, l'équation est la suivante :

| |
|---|
| Nombre de fragments à séquencer (n) = $\log_{(1-p)}(0,05)$, si P = 95 %. |
|---|

Méthode de séquençage

Les réactions de séquençage ont été effectuées à l'aide du DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit with 7-deaza dGTP (Amersham Life Science Inc., USA). Pour chacune des 4 réactions de séquençage, $0,3 \mu\text{g}$ d'ADN plasmidique ont été mis en présence du mélange réactionnel prêt à l'emploi et de $0,5 \text{ pmol}$ de l'une des amorces M13-Forward ou M13-Reverse marquées au colorant fluorescent IRD-800 (Biolegio, Malden, Pays-Bas).

Les fragments marqués ont été synthétisés au cours de 20 cycles comprenant une phase de dénaturation à $95 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 30 s, suivie par une phase d'hybridation à $45 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 15 s et une phase d'élongation à $70 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 30 s.

Les produits de synthèse ont été dénaturés à $70 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 180 s puis séparés par migration en gel d'acrylamide 5,5 % (KB+ Gel Matrix, Li-Cor Inc., Lincoln, USA).

La lecture des séquences a été effectuée à l'aide du séquenceur automatique Gene ReadIR™ DNA Analysis System L4200S-1 (LI-Cor Inc., Lincoln, USA).

Traitement des séquences

Les séquences du brin dans lequel s'inscrit la séquence de l'amorce d'amplification 27F (Rochelle *et al.*, 1992) ont été exploitées telles quelles, tandis que les séquences correspondant au brin complémentaire ont été transcrites. Leur transcription a été réalisée à l'aide des logiciels Microsoft® Word 2000 et Microsoft® Excel 2000 (Microsoft Corporation, Washington, USA) selon la procédure suivante : le format de la police des séquences a, si nécessaire, été uniformisé dans Word de façon à inclure exclusivement des lettres capitales. Les données, livrées sous la forme d'une succession de lettres (symboles des nucléotides), ont ensuite été copiées dans Excel et mises en forme à l'aide de la fonction Convertir de façon à avoir une lettre par cellule. L'ordre des lettres ainsi mises en forme a été inversé à l'aide de la fonction Concatener du logiciel Excel. Pour terminer la transcription de la séquence, le symbole de chacun des nucléotides successifs a été remplacé par celui du nucléotide complémentaire à l'aide de la fonction Rechercher-Remplacer de Excel en prenant soin de remplacer un caractère majuscule par un caractère minuscule et de "respecter la casse".

La région V1 de chacune des séquences, brutes ou transcrites selon le brin concerné, a été localisée visuellement à l'aide des séquences repères données au paragraphe 2.4.2. Les séquences V1 ont été alignées dans Word et comparées visuellement. Elles ont été regroupées sur base de leurs similitudes et la séquence consensus du groupe a, le cas échéant, été déterminée. Pour déterminer l'origine bactérienne des séquences V1, la séquence consensus du groupe de similitude ou, en l'absence de séquence consensus, toutes les séquences du groupe ont été comparées avec celles de la banque de l'EMBL à l'aide du moteur de recherche FASTA (Pearson & Lipman, 1988) de l'EBI.

La même démarche a été effectuée pour analyser la région V2 des leuconostocs.

2.5 Isolement des micro-organismes du grain de kéfir KJ et identification des isolats

2.5.1 Isolement des micro-organismes du grain de kéfir

Mise en culture

Les micro-organismes du grain KJ ont été isolés à partir d'échantillons de grains dispersés dans une solution de dilution comme décrit au paragraphe 2.3.2.

Des aliquotes de 0,1 ml de la suspension diluée ont été étalées sur les milieux de culture sélectifs repris dans Tableau 2.3.1, excepté pour les lactobacilles. Les lactobacilles ont été isolés sur les milieux Rogosa-CW (Kojima *et al.*, 1993) et KPL (Toba *et al.*, 1986).

Amplifications géniques pour la sélection des isolats de lactobacilles

Les lactobacilles identifiés dans le grain de kéfir KJ par la voie moléculaire comprenaient 3 espèces. Des isolats de chacune des espèces identifiées ont été sélectionnés sur le milieu Rogosa-CW par amplifications géniques (PCR) effectuées à l'aide d'amorces spécifiques déterminées dans le cadre de ce travail.

Les séquences des amorces utilisées, en combinaison avec l'amorce R350, pour sélectionner les isolats de *Lb. kefiranofaciens*, de *Lb. kefiri* et de *Lb. parakefiri* étaient respectivement : 5'-ACTTCGGTGAGGACGCTG-3', 5'-GAACGCGTTTCCGTTATTG-3' et 5'-CGGCCAATGATTTTCAGGTG-3'. Les positions, sur le gène de l'ARNr 16S de la souche type de *Escherichia coli*, numéro d'accèsion X80725 (Cilia *et al.*, 1996), du nucléotide terminal de l'extrémité 3' de chacune des amorces spécifiques étaient 83, 22 et 73 respectivement.

L'ADN a été extrait à partir des colonies par la méthode décrite au paragraphe 2.4.4. Les réactions d'amplification géniques ont été mises en oeuvre de la façon décrite au paragraphe 2.4.5, avec des températures d'hybridation communes aux trois couples d'amorces, de respectivement 45 °C et 38 °C pour les 10 premiers et les 20 cycles suivants.

La spécificité des amorces avait été vérifiée sur les souches types des trois espèces visées. Utilisées avec l'amorce R350, les amorces spécifiques à chacune des espèces amplifiaient des fragments de la longueur attendue (environ 300 bp) lorsqu'ils étaient appliqués à la souche type de l'espèce ciblée, et pour *Lactobacillus kefiranofaciens* à celles de ses deux sous-espèces, tandis qu'aucun fragment n'était amplifié lorsqu'ils étaient appliqués aux deux autres espèces du groupe (résultats non présentés).

Purification des isolats

Les isolats ont été purifiés par des isolements successifs sur leur milieu de culture sélectif respectif. La pureté des isolats a été vérifiée par l'observation microscopique (grossissement de 1000 X) de l'homogénéité de la morphologie des cellules et, pour les

lactobacilles, par la réponse négative de PCR effectuées avec les amorces spécifiques aux autres espèces du groupe identifiées dans le grain KJ.

2.5.2 Tests d'identification

Bactéries lactiques

Préalablement aux tests phénotypiques, les isolats purifiés ont été cultivés 24 heures à 30 °C en bouillon MRS acidifié à un pH de 5,4 avec de l'acide acétique pour les lactobacilles, en bouillon M17 pour les coques lactiques et en bouillon MRS pour les leuconostocs. Les lactobacilles ont été incubés en anaérobiose tandis que les coques lactiques et les leuconostocs ont été cultivés en aérobiose.

La réaction des isolats bactériens à la coloration de Gram a été testée à l'aide du coffret Color Gram 2 et leur profil de fermentation a été déterminé en galeries API 50 CH. Le coffret Color Gram 2 et les galeries API 50 CH ont été mis en oeuvre selon les prescriptions du fabricant (Biomérieux, France).

La voie de fermentation des isolats a été déterminée selon la méthode de Gibson & Abdel-Malek (1945), dans le milieu au jus de tomate décrit par les auteurs pour les lactobacilles, dans du bouillon M17 pour les coques lactiques et dans du bouillon MRS pour les leuconostocs.

Le bouillon MRS était fourni par Oxoid (Basingstoke, Royaume-Uni) et le bouillon M17, par Merck (Darmstadt, Allemagne).

Les protéines d'un isolat de *Leuconostoc* sp. ont été analysées en sous-traitance par le Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (Gand, Belgique) par la méthode d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). D'après leur description méthodologique, la préparation des extraits cellulaires et l'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) ont été exécutées selon le protocole établi par Pot *et al.* (1994) tandis que le profil des protéines a été digitalisé et comparé aux profils de souches de référence de bactéries lactiques à l'aide du logiciel Bionumerics (Applied Maths, Belgique).

Bactérie acétique

La bactérie acétique a été identifiée en sous-traitance par le Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (Gand, Belgique) sur base de la séquence de l'ADNr 16S de l'isolat. D'après leur description méthodologique, l'ADN génomique a été préparé selon le protocole établi par Niemann *et al.* (1997). L'ADN a été amplifié avec les amorces 16F27 et 16R1522 de l'institut et purifié à l'aide du NucleoFast® 96 PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne).

Les réactions de séquençage ont été effectuées à l'aide du BigDye® Terminator Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et purifiées à l'aide du Montage™ SEQ₉₆ Sequencing Reaction cleanup Kit (Millipore, Bedford, MA, USA). Le séquençage a été effectué à l'aide d'un ABI Prism® 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Les réactions de séquençage ont été effectuées avec 3 amorces de l'institut : 16F358, 16R339 et 16R519, de sorte que les morceaux de séquence se chevauchent partiellement. Le chevauchement partiel des morceaux de séquence facilite leur assemblage effectué ici à l'aide du programme AutoAssembler™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

L'analyse phylogénétique des séquences de l'isolat et des souches types a été effectuée à l'aide du logiciel BioNumerics (Applied Maths, Belgique).

Levure

La levure a été identifiée par l'observation de la morphologie des cellules et par l'examen de caractéristiques physiologiques (profil de fermentation de sucres et d'activité enzymatique).

Le profil de fermentation et d'activité enzymatique a été déterminé à l'aide d'une galerie API Candida mise en oeuvre selon les prescriptions du fabricant (Biomérieux, France).

2.6 Formation du grain de kéfir KJ

2.6.1 Préparation des extraits de grain

La microflore du grain KJ a été dispersée dans du lait UHT par battage pendant 10 minutes à l'aide d'un Stomacher Lab-Blender 400 (Seward Medical UAC House, Londres). Une masse minimale de 100 g de grains a été dispersée dans un volume équivalent de lait (rapport poids:volume de 1:1).

Le laitensemencé a été filtré au travers de 4 couches de gaze stérilisées à l'autoclave (121 °C pendant 20 minutes) ou au travers d'un tamis souple synthétique (filtre à chicorée) stérilisé dans de l'eau de Javel et rincé à l'eau stérile.

2.6.2 Conditions de préculture des souches individuelles

Préalablement aux essais mis en oeuvre à partir du consortium reconstitué, les isolats purifiés ont été cultivés dans les conditions précisées dans le Tableau 2.6.1.

Tableau 2.6.1 : Conditions de préculture des souches microbiennes utilisées dans les essais mis en œuvre à partir du consortium reconstitué.

| Identification des souches | Bouillons de culture | Conditions d'incubation |
|--|--|---------------------------------|
| <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> (KPL 4) | KPL (Toba <i>et al.</i> , 1986) | 3 jours à 30 °C, en anaérobiose |
| <i>Lactobacillus kefir</i> (KPL 6) | KPL (Toba <i>et al.</i> , 1986) | 3 jours à 30 °C, en anaérobiose |
| <i>Lactobacillus parakefir</i> (R-CW 110) | Rogosa-CW (Kojima <i>et al.</i> , 1993) | 3 jours à 30 °C, en anaérobiose |
| <i>Lactococcus lactis</i> (RM 31) | Lait UHT | 3 jours à 30 °C en aérobiose |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (RM 2) | Lait UHT | 3 jours à 30 °C, en aérobiose |
| <i>Acetobacter</i> sp. (LMG 24630) | Acetobacter Peroxydans Medium (Anonyme DSMZ, 2001) | 3 jours à 25 °C, en aérobiose |
| <i>Kazachstania exigua</i> (MUCL 49750) | YGC (FIL 94B:1991) | 5 jours à 22 °C, en aérobiose |

2.6.3 Bouillons de synthèse utilisés pour vérifier les propriétés d'agglutination du consortium

La vérification de l'activité agglutinante du consortium extrait du grain a été effectuée dans du bouillon Rogosa-CW (Kojima *et al.*, 1993), du bouillon KPL (Toba *et al.*, 1986), du bouillon MRS (Oxoid, Basinstoke, Royaume-Uni) acidifié à un pH de 5,4 avec de l'acide acétique glacial (UCB-RPL, Louvain, Belgique) stérilisé par filtration et du bouillon M17 (Oxoid, Basinstoke, Royaume-Uni).

2.6.4 Bouillons à base de lait utilisés dans les essais d'aptitude du lait à la croissance et dans les essais de formation de biofilms

Les bouillons consistaient en du lait nature (lait), du lait acidifié à un pH de 5,5 avec de l'acide acétique glacial (UCB-RPL, Louvain, Belgique) stérilisé par filtration (lait_{5,5}), du lait additionné à raison de 5 % (v/v) d'éthanol absolu (VWR ; Fontenay sous Bois, France) stérilisé par filtration (lait + éthanol), du lait additionné d'une solution stérile de D-glucose (Merck ; Darmstadt, Allemagne) 10 % (p/v) de façon à avoir une concentration finale en glucose de 5 g.l⁻¹ (lait + glucose), du lait additionné d'une solution stérile d'extrait de levure (Oxoid ; Basinstoke, Royaume-Uni) 10 % (p/v) de façon à avoir une concentration finale en extrait de levure de 5 g.l⁻¹ (lait + extrait de levure) et du lait additionné de 0,25 ml.l⁻¹ de présure (Berthelot ; Meursault, France) stérilisée par filtration (lait + présure).

Le lait utilisé était du lait UHT demi-écrémé de la marque INEX (Bavegem, Belgique) pour les premiers essais conduit à partir du consortium extrait du grain et à partir du consortium reconstitué, et de la marque CANDIA (Lyon, France) pour les seconds essais conduits à partir des ces deux consortiums.

2.6.5 Taux d'ensemencement des bouillons

Un volume de 20 ml de chacun des bouillons de culture a été ensemencé en boîte de Petri avec 2 ml d'extrait de grain ou avec 0,2 ml de chacune des précultures des souches individuelles.

2.6.6 Conditions de culture des témoins de croissance des souches individuelles

En parallèle des essais de formation de biofilms à partir du consortium reconstitué, les souches individuelles ont été cultivées dans les conditions reprises au Tableau 2.6.2.

Tableau 2.6.2 : Conditions de culture des témoins de croissance des souches individuelles utilisées dans les essais de formation de biofilms à partir du consortium reconstitué.

| Identification des souches | Bouillons de culture | Conditions d'atmosphère |
|--|---|-------------------------|
| <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> (KPL 4) | MRS _{5,4} * (Oxoid, Basinstoke, Royaume-Uni) | Anaérobiose |
| <i>Lactobacillus kefiri</i> (KPL 6) | MRS _{5,4} * (Oxoid, Basinstoke, Royaume-Uni) | Anaérobiose |
| <i>Lactobacillus parakefiri</i> (R-CW 110) | MRS _{5,4} * (Oxoid, Basinstoke, Royaume-Uni) | Anaérobiose |
| <i>Lactococcus lactis</i> (RM 31) | M17 (Oxoid, Basinstoke, Royaume-Uni) | Aérobiose |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (RM 2) | MRS (Oxoid, Basinstoke, Royaume-Uni) | Aérobiose |
| <i>Acetobacter</i> sp. (LMG 24630) | Acetobacter Peroxydans Medium (Anonyme DSMZ, 2001) | Aérobiose |
| <i>Kazachstania exigua</i> (MUCL 49750) | YGC (FIL 94B:1991) | Aérobiose |

*pH ajusté avec de l'acide acétique glacial (UCB-RPL, Louvain, Belgique) stérilisé par filtration.

3 RÉSULTATS

3.1 Qualité hygiénique du grain de kéfir KJ

3.1.1 Evolution du pH du grain au cours des cycles hebdomadaires de culture

L'évolution de l'acidité des grains au cours des cycles de culture appliqués au laboratoire a été établie pour évaluer la sensibilité du grain de kéfir KJ à une contamination par des germes pathogènes.

La succession des cycles de culture appliqués au laboratoire se caractérisait par une discontinuité hebdomadaire : une période d'attente de 48 heures succédait à 5 cycles de 24 heures. Parallèlement, le taux d'ensemencement du lait était réajusté une fois par semaine et non à l'occasion de chacun des cycles de culture. Cette discontinuité dans la succession des cycles et le réajustement hebdomadaire du taux d'ensemencement créaient des conditions de culture variables entre les cycles de culture. Cette variabilité a été prise en compte en mesurant le pH de grains prélevés indifféremment au cours de chacun des cycles de culture successifs.

Par ailleurs, le procédé d'échantillonnage des grains (paragraphe 2.2.1) modifiait temporairement les conditions de culture. Pour minimiser l'influence de ces manipulations sur l'évolution de l'acidité des grains, le nombre de prélèvement effectués par cycle de culture a été limité à 1.

Les grains ont été prélevés et leur pH relevé après des durées d'incubation variables de façon à couvrir les 24 heures d'un cycle de culture.

Dans les conditions du laboratoire, taux d'ensemencement de 20 % et température de 22 °C (paragraphe 2.1.1), le pH du grain de kéfir KJ variait de 4,2 - 4,3 à 3,4 - 3,6 au cours d'un cycle moyen de culture de 24 heures (Figure 3.1.1). Le cycle de culture était répété 5 fois puis prolongé par une période de 48 heures pendant laquelle le grain était maintenu dans le lait acidifié, c'est-à-dire à un pH inférieur à 3,6.

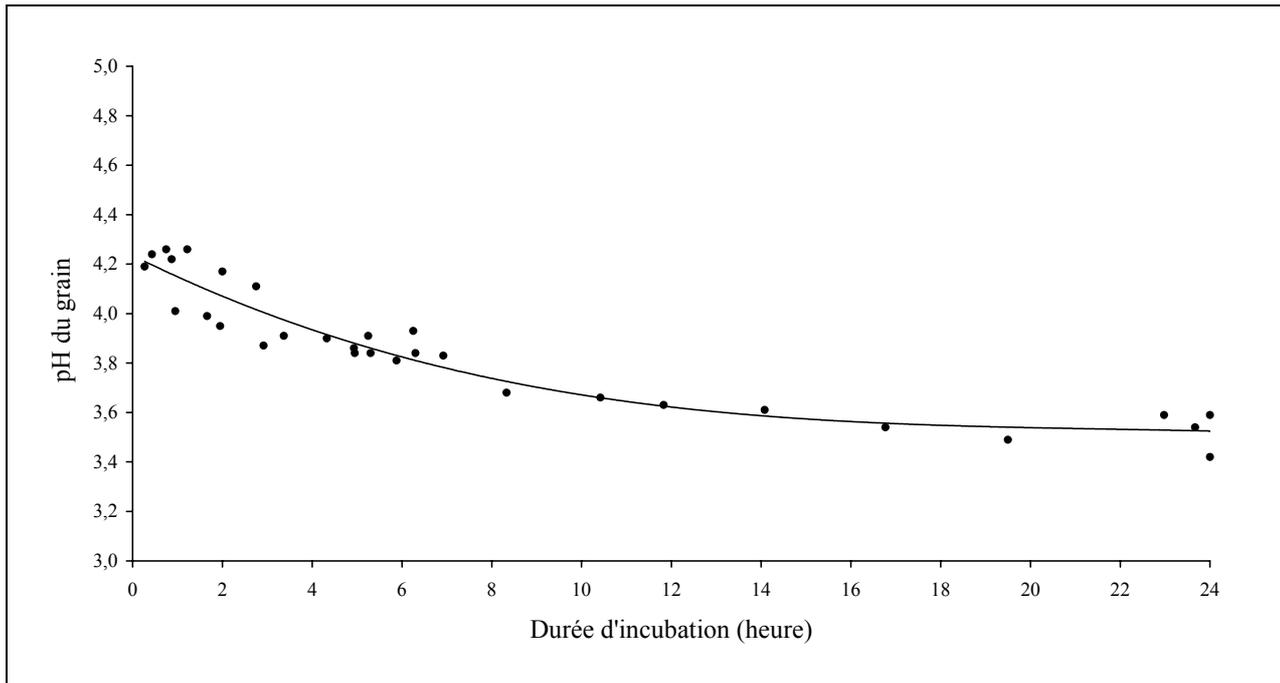


Figure 3.1.1 : Evolution de l'acidité du grain de kéfir KJ au cours d'un cycle de culture de 24 heures.

3.1.2 Germes pathogènes et indicateurs de défauts d'hygiène

L'innocuité du grain de kéfir KJ a été vérifiée par la recherche d'une contamination par des germes pathogènes et indicateurs de défauts d'hygiène.

Les germes recherchés ont été sélectionnés sur base des prescriptions législatives et sur base des recommandations de la Fédération internationale de laiterie (FIL, Bruxelles). Ils comprenaient *Listeria monocytogenes*, les *Salmonella* sp., les staphylocoques à coagulase positive, les coliformes, les moisissures et les micro-organismes contaminants tels que définis par la norme FIL 153:1991.

Aucune croissance des germes recherchés dans le lait fermenté à partir du grain de kéfir KJ n'a été observée aux seuils de détection appliqués (Tableau 3.1.1.).

Les seuils de détection appliqués pour la recherche des germes prescrits par des textes de loi, c'est-à-dire tous les germes exceptés les micro-organismes contaminants, correspondaient aux limites fixées par ceux-ci ou permettaient, dans le cas des coliformes, de les respecter. Le seuil de détection appliqué pour les coliformes respectait la recommandation, plus restrictive, de la FIL : l'arrêté royal prévoit l'absence de coliformes dans 0,1 ml tandis

que, pour les levains, la norme 149A:1997 de la FIL prescrit l'absence de ce groupe microbien dans 1 ml de produit.

Le seuil de détection des micro-organismes contaminants, de 10 ufc.ml^{-1} , permettait de respecter la recommandation de la FIL relative à ce groupe microbien. La FIL recommande, dans sa norme de composition des levains lactiques de cultures de bactéries lactiques (149A:1997), un niveau de contamination inférieur à 50 ufc.g^{-1} .

Tableau 3.1.1 : Qualité hygiénique du lait fermenté à partir du grain de kéfir KJ (juin 2007).

| Germes ou groupes de germes recherchés | Résultats |
|--|-----------------------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i> | absence dans 25 ml |
| <i>Salmonella</i> sp. | absence dans 25 ml |
| Staphylocoques à coagulase positive | $< 10 \text{ ufc.ml}^{-1}$ |
| Coliformes | absence dans 1 ml |
| Moisissures | $< 100 \text{ ufc.ml}^{-1}$ |
| Micro-organismes contaminants | $< 10 \text{ ufc.ml}^{-1}$ |

3.2 Identification et quantification des groupes microbiens du grain de kéfir KJ

Les grains de kéfir comprennent une microflore banale diversifiée, composée de bactéries lactiques et de levures, parfois associées à des bactéries acétiques et/ou à des microcoques. Les bactéries lactiques recensées dans la littérature relative à la composition microbienne de grains de kéfir incluent des lactobacilles, des pédiocoques, des coques lactiques, des leuconostocs et *Weissella viridescens* (Tableau 1.1.1).

3.2.1 Identification des groupes microbiens du grain

Les groupes microbiens participant au consortium du grain KJ, parmi ceux recensés dans la littérature, ont été identifiés sur base de leur capacité à croître sur des milieux de culture sélectifs.

Les milieux de culture sélectifs utilisés (Tableau 2.3.1) respectivement pour l'isolement des lactobacilles, des coques lactiques, des leuconostocs, des bactéries acétiques et des levures ont conduit à un développement microbien.

Aucun développement microbien n'était par contre observé sur les milieux utilisés pour l'isolement des pédiocoques, de *Weissella viridescens* et des microcoques. Dans les trois cas, l'adéquation des conditions de culture était confirmée par le développement microbien obtenu en parallèle à partir de témoins positifs : la souche type de *Pediococcus acidilactici* pour les pédiocoques, la souche DSM 20248 d'origine laitière de *W. viridescens* pour les représentants de ce taxon et du lait cru pour les microcoques. Le développement, à partir du lait cru, de micro-organismes s'apparentant à des microcoques était confirmé par leur coloration de Gram et leur réaction au test de catalase ainsi que par la morphologie et l'agencement des cellules. Tels que décrits (Kocur, 1984), les microcoques présumés développés à partir du lait cru étaient Gram positifs, catalase positifs, de forme sphérique et certains étaient associés en tétrades.

Les colonies développées à partir du kéfir KJ sur le milieu utilisé pour l'isolement des lactobacilles présentaient deux types morphologiques : certaines étaient blanches et opaques tandis que d'autres étaient translucides. Les colonies développées sur chacun des autres milieux de culture ne présentaient pas, entre elles, de différences morphologiques significatives.

Les caractéristiques cellulaires de réaction à la coloration de Gram, de réaction au test de catalase et morphologiques étaient uniformes entre les colonies bactériennes développées sur un même milieu, y compris pour celles, différentes d'aspect, développées sur le milieu dédié aux lactobacilles. Elles correspondaient (Tableau 3.2.1) à celles décrites pour chacun des groupes microbiens présumés : cellules Gram positives et catalase négatives, en forme de bâtonnets pour les lactobacilles (Kandler & Weiss, 1986) ou sphériques pour les coques lactiques et les leuconostocs (Hardie, 1986 ; Garvie, 1984) ; cellules Gram négatives, catalase positives, ovoïdes et souvent en paires pour les bactéries acétiques (De Ley *et al.*, 1984).

Les levures formaient des colonies glabres et présentaient une morphologie cellulaire typique de ce groupe par sa taille, supérieure à celle des bactéries, et par la formation, pour certaines d'entre-elles, de bourgeons.

Tableau 3.2.1 : Coloration de Gram, réaction au test de catalase et morphologie cellulaire des bactéries développées sur les milieux de culture sélectifs.

| Groupes microbiens présumés | Coloration de Gram | Test de catalase | Morphologie des cellules |
|------------------------------|--------------------|------------------|---|
| Lactobacilles | | | |
| Colonies blanches et opaques | Positif | Négatif | Cellules allongées (bâtonnets) de longueur variable |
| Colonies translucides | Positif | Négatif | Cellules allongées (bâtonnets) de longueur variable |
| Coques lactiques | Positif | Négatif | Cellules sphériques |
| Leuconostocs | Positif | Négatif | Cellules sphériques |
| Bactéries acétiques | Négatif | Positif | Cellules ovoïdes par paires |

Examens effectués sur 3 colonies.

3.2.2 *Quantification des groupes microbiens du grain*

Les cinq groupes microbiens identifiés dans le grain de kéfir KJ - les lactobacilles, les coques lactiques, les leuconostocs, les bactéries acétiques et les levures - ont été dénombrés par comptage des colonies développées sur les milieux de culture sélectifs (Tableau 2.3.1).

Leur abondance dans le grain a été estimée à partir de deux échantillons de grains cultivés en parallèle dans les conditions habituelles (paragraphe 2.1.1). La quantité de grains mise en oeuvre au début des cycles hebdomadaires de culture, dans chacune des deux cultures individuelles, était de 50 ± 10 g.

Les dénombrements microbiens effectués dans les deux cultures individuelles de grains ont été répétés hebdomadairement pendant 2 ou 7 semaines selon le groupe microbien examiné. Les leuconostocs et les bactéries acétiques ont été dénombrés pendant 2 semaines tandis que les lactobacilles, les coques lactiques et les levures ont été dénombrés pendant 7 semaines. Le lait UHT utilisé pendant la durée de l'essai provenait d'un même lot.

L'abondance moyenne des différents groupes microbiens participant au consortium était inégale (Tableau 3.2.2). En terme d'unités formant colonies, les bactéries lactiques représentaient 73 % de la flore totale du grain tandis que les bactéries acétiques et les levures en représentaient respectivement 21 % et 6 %. Parmi les bactéries lactiques, les lactobacilles étaient plus nombreux d'un facteur 1000 que les coques lactiques et les leuconostocs. Au sein

de ce groupe lactique minoritaire, les leuconostocs étaient, en moyenne, 4 fois plus abondants que les coques lactiques.

Tableau 3.2.2 : Dénombrements des groupes microbiens participant au consortium du grain de kéfir KJ.

| Groupes microbiens | Moyennes géométriques (ufc.g ⁻¹) | Ecart types relatifs géométriques (%) | | |
|---------------------|--|---------------------------------------|----------------|---------------|
| | | De l'ensemble (n) | Entre semaines | Entre doubles |
| Lactobacilles | 1,4 · 10 ⁸ | 41 (14) ^a | 28 | 28 |
| Coques lactiques | 3,9 · 10 ⁴ | 420 (14) ^a | 440 | 29 |
| Leuconostocs | 1,5 · 10 ⁵ | 12 (4) ^b | - | - |
| Bactéries acétiques | 4,0 · 10 ⁷ | 18 (4) ^b | - | - |
| Levures | 1,1 · 10 ⁷ | 43 (14) ^a | 35 | 24 |

n : nombre de mesures effectuées à intervalle d'une semaine dans 2 cultures de grains de kéfir pendant : a) 7 semaines ; b) 2 semaines.

Les dénombrements de lactobacilles, de coques lactiques et de levures ont été effectués en parallèle, dans le même contexte expérimental et statistique. Ces dénombrements étaient assortis d'une variabilité inégale, 10 fois plus élevée pour les coques lactiques que pour les lactobacilles et les levures (Ecart types relatifs géométriques de l'ensemble des résultats, Tableau 3.2.2). Cette inégalité était observée au cours du temps mais pas ou peu entre les doubles (Ecart types relatifs géométriques entre semaines et entre doubles respectivement, Tableau 3.2.2) ; dans ce cas la variabilité des coques lactiques était moindre.

Cette différence de variabilité des dénombrements de coques lactiques entre les objets (temps-doubles) indiquait qu'elle ne pouvait provenir exclusivement de la variabilité associée à la précision de la méthode de dénombrement. Pour confirmer cette déduction et préciser l'origine, méthodologique ou biologique, de la variabilité observée dans les dénombrements des deux autres groupes microbiens, la précision des méthodes de dénombrement appliquées aux lactobacilles, aux coques lactiques et aux levures a été estimée à partir d'échantillons de grain provenant d'un lot homogène de grains. Les précisions de chacune de ces méthodes de dénombrement étaient, en terme d'écart type relatif géométrique, de 9 %, 7 % et 4 % respectivement.

Pour ces 3 groupes microbiens, la variabilité observée au cours du temps et celle observée entre les cultures individuelles traitées en parallèle étaient plus élevées que la variabilité liée à la précision de leur méthode de dénombrement (Ecart types relatifs

géométriques entre semaines et entre doubles, Tableau 3.2.2). Dans les deux cas de figure, la variabilité avait une signification biologique.

3.2.3 Identification des conditions de culture à l'origine de la variabilité des abondances microbiennes dans le grain de kéfir

Les sources potentielles de cette variabilité ont été identifiées par une analyse du contexte environnemental des essais (paragraphe 4.2.3). Certaines ont été précisées en analysant la réponse de la microflore du grain à des modifications des conditions de culture. La réponse de la microflore a été évaluée par le dénombrement des micro-organismes du grain ou par la visualisation de l'activité β -galactosidase du consortium microbien du grain.

Influence de séjours répétés dans de l'eau et du rinçage des grains sur l'abondance du grain en lactobacilles, en coques lactiques et en levures

Le renouvellement du lait était interrompu les samedis et dimanches et, pendant cette période d'attente, le grain était habituellement maintenu à 22 °C dans le lait fermenté. L'alternative qui a été testée était de conserver le grain dans de l'eau à 4 °C. Répétés hebdomadairement pendant 7 semaines, ces séjours dans de l'eau avaient une incidence sur l'abondance des lactobacilles du grain mais pas sur celle des coques lactiques et des levures (Tableau 3.2.3).

La maintenance habituelle des grains comprend leur rinçage à l'eau avant l'ensemencement du lait frais. La suppression de cette étape de rinçage pendant 7 semaines n'a pas modifié l'abondance des groupes microbiens dans le grain (Tableau 3.2.3).

Tableau 3.2.3 : Dénombrements des groupes microbiens du grain de kéfir KJ soumis à des conditions de culture différentes par rapport à celles appliquées habituellement.

| Conditions de maintenances modifiées par rapport aux conditions habituelles | Dénombrements microbiens (ufc.g ⁻¹) | | |
|---|---|-----------------------|-----------------------|
| | Lactobacilles | Coques lactiques | Levures |
| Conservation hebdomadaire dans de l'eau pendant 2 jours | 1,3 . 10⁷ | 1,1 . 10 ⁴ | 7,4 . 10 ⁶ |
| Pas de rinçage des grains entre deux cycles de culture | 2,1 . 10 ⁸ | 1,1 . 10 ⁵ | 2,1 . 10 ⁷ |

Moyennes géométriques de 2 mesures. La comparaison des valeurs avec celles obtenues dans les conditions de maintenance habituelles (Tableau 3.2.2) a été effectuée par le test t de Dunnett. La valeur en caractère gras est différente de celle obtenue dans les conditions de maintenance habituelles au seuil $\alpha = 0,05$.

Influence de l'agitation des grains pendant la fermentation sur l'activité β -galactosidase du consortium

L'activité β -galactosidase de la microflore du grain a été visualisée à l'aide d'un substrat chromogène ajouté au lait. La galactosidase est l'enzyme qui catalyse l'hydrolyse du lactose, la principale source de carbone du lait. En se substituant au lactose, le substrat chromogène, du X-gal, révèle l'activité fermentaire et indirectement la croissance des micro-organismes capables de fermenter le lactose.

Les micro-organismes du grain capables d'une activité β -galactosidase se développaient inégalement à la surface de grains maintenus au repos pendant le cycle de fermentation (Figure 3.2.2, a I et a II). Lorsque le milieu était agité pendant la fermentation, ces micro-organismes se développaient uniformément à la surface du grain (Figure 3.2.2, b).

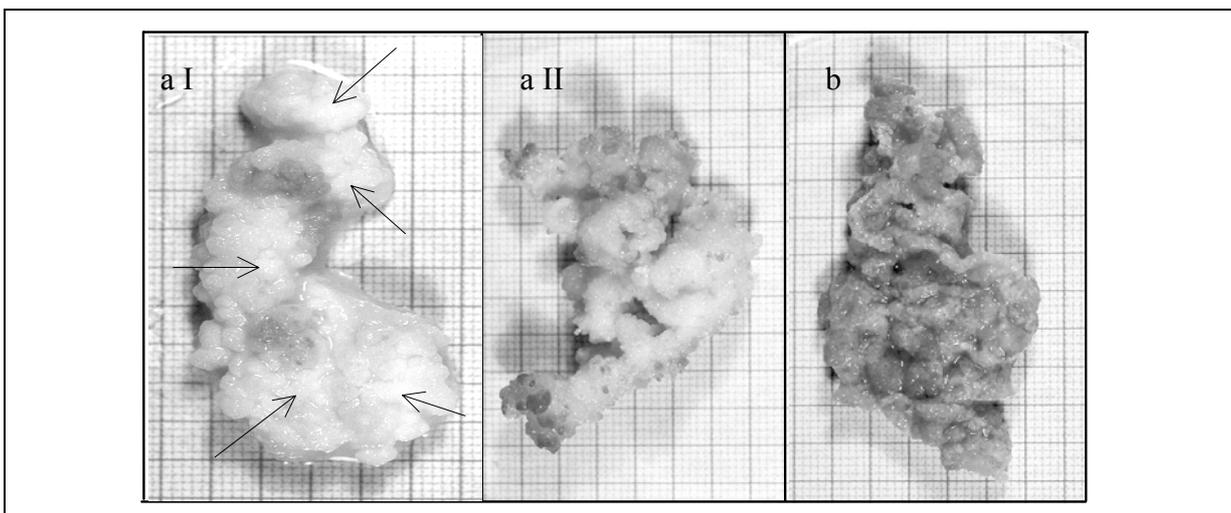


Figure 3.2.2 : Visualisation du développement microbien du grain à l'aide d'un substrat chromogène (X-gal). La répartition des micro-organismes capables de métaboliser le X-gal, zones foncées, était hétérogène après un jour de culture sans agitation (a I et a II), tandis qu'elle était homogène lorsque la culture était agitée (b). Les prélèvements microbiens destinés à vérifier la présence de micro-organismes capables de métaboliser le X-gal dans les zones restées inactives du grain ont été effectués aux endroits indiqués par les flèches (a I).

La présence, dans les zones restées inactives du grain, de bactéries capables d'une activité galactosidase a été vérifiée à partir d'isolats prélevés dans ces zones (Figure 3.2.2, a I). Les colonies formées sur le milieu de synthèse à partir de ces prélèvements étaient

capables de métaboliser le X-gal : elles se coloraient (en bleu) après incubation en présence du substrat chromogène.

3.3 Identification moléculaire des bactéries lactiques du grain de kéfir KJ

Les bactéries lactiques du grain de kéfir KJ ont été identifiées par une approche moléculaire.

3.3.1 Identification des régions variables de l'ADNr 16S

L'approche moléculaire de l'identification bactérienne était basée sur l'analyse de courtes séquences de l'ADNr 16S. Les courtes séquences les plus appropriées à l'identification des lactobacilles, des coques lactiques et des leuconostocs de grains de kéfir ont, dans ce but, été déterminées en comparant des séquences choisies de l'ADNr 16S.

Sélection des séquences

Les séquences sélectionnées à cette fin (Tableau 3.3.1) provenaient de bactéries appartenant aux taxons identifiés dans des grains de kéfir (Tableau 1.1.1) et, pour renforcer la représentativité des coques lactiques et des leuconostocs, de bactéries appartenant à des taxons proches de ceux identifiés dans des grains. Les séquences sélectionnées incluaient ainsi une séquence de la sous-espèce *hordnia* de *Lactococcus lactis* et des séquences de *Leuconostoc citreum* et de *Ln. pseudomesenteroides*, deux espèces dont les positions dans l'arbre phylogénique établi à partir de l'ADNr 16S sont proches des espèces *Ln. mesenteroides* et *Ln. lactis* identifiées dans des grains de kéfir (Collins *et al.*, 1991).

Les séquences sélectionnées (Tableau 3.3.1) provenaient de la souche type des taxons ou de souches dont la fiabilité de l'identification était appuyée par une publication.

Les génomes des souches de *Lactobacillus acidophilus*, de *Lb. brevis* et de *Leuconostoc mesenteroides* comprenaient respectivement 4, 5 et 4 opérons de l'ADNr 16S. Les séquences des 4 opérons de *Ln. mesenteroides* étaient identiques, tandis que celles des opérons des *Lactobacillus* sp. différaient entre-elles par un nombre variable de nucléotides : la séquence d'un opéron de *Lb. acidophilus* différait de 13 nucléotides par rapport aux autres, tandis que les séquences de 3 des 5 opérons de *Lb. brevis* différaient, entre elles et par rapport aux deux autres, de 2 ou 3 nucléotides selon la paire considérée.

Tableau 3.3.1 : Séquences de l'European Molecular Biology Laboratory (Stoesser *et al.*, 2001) utilisées pour identifier les régions variables de l'ADNr 16S des bactéries lactiques ciblées.

| Numéro d'accèsion EMBL | Longueur de la séquence, en pb | Taxon | Référence |
|------------------------|--------------------------------|--|---------------------------------|
| CP000033* | 1572 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Altermann <i>et al.</i> , 2005 |
| CP000416* | 1563 | <i>Lactobacillus brevis</i> | Makarova <i>et al.</i> , 2006 |
| AM113777* | 1559 | <i>Lactobacillus curvatus</i> , souche type | non publié |
| AY773949* | 1518 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , souche type | Kao <i>et al.</i> , 2007 |
| AY773948 | 1494 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , souche type | Kao <i>et al.</i> , 2007 |
| AY050173 | 1505 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> | Germond <i>et al.</i> , 2003 |
| M58819 | 1580 | <i>Lactobacillus fermentum</i> , souche type | non publié |
| AF519171* | 1747 | <i>Lactobacillus gasseri</i> , souche type | non publié |
| AF429509 | 504 | <i>Lactobacillus helveticus</i> , souche type | non publié |
| AJ621553* | 1456 | <i>Lactobacillus kefir</i> , souche type | non publié |
| AJ575259* | 1516 | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> , souche type | Vancanneyt <i>et al.</i> , 2004 |
| D79212* | 1522 | <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , souche type | Mori <i>et al.</i> , 1997 |
| D16550 | 1520 | <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> , souche type | Mori <i>et al.</i> , 1997 |
| AY026750* | 1396 | <i>Lactobacillus parakefir</i> , souche type | Krooneman <i>et al.</i> , 2002 |
| D79210* | 1519 | <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> , souche type | non publié |
| AJ640078 | 1517 | <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> , souche type | Bringel <i>et al.</i> , 2005 |
| AF429476 | 507 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , souche type | Dobson <i>et al.</i> , 2004 |
| AB100803* | 1499 | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , souche type | Mori <i>et al.</i> , 2004 |
| AB100802 | 1499 | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , souche type | Mori <i>et al.</i> , 2004 |
| AB100804 | 1499 | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordnia</i> , souche type | Mori <i>et al.</i> , 2004 |
| AF111948* | 1505 | <i>Leuconostoc citreum</i> , souche type | Choi <i>et al.</i> , 2003 |
| AB023968* | 1451 | <i>Leuconostoc lactis</i> , souche type | non publié |
| CP000414* | 1549 | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> , souche type | Makarova <i>et al.</i> , 2006 |
| AB023237* | 1448 | <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , souche type | non publié |
| AY188354* | 1539 | <i>Streptococcus thermophilus</i> , souche type | non publié |

*Séquences utilisées pour localiser les régions variables de l'ADNr 16S. Les séquences enregistrées sous un numéro d'accèsion commençant par CP comprennent toutes les copies ou opérons de l'ADNr 16S.

Dans certains cas, les différentes sous-espèces identifiées dans des grains de kéfir étaient représentées dans la sélection des séquences d'ADNr 16S par une séquence unique (Tableau 3.3.1). Dans ces cas, les séquences de l'ADNr 16S des différentes sous-espèces étaient identiques, ou quasiment, entre elles. Entre les sous-espèces *kefirgranum* et *kefiranofaciens* de *Lb. kefiranofaciens*, les séquences des souches types, numéros d'accension respectifs AJ575259 et AJ575261, comportaient tout au plus un nucléotide différent. Cette unique différence portait en fait sur la présence dans une des deux séquences d'un nucléotide variable qui pouvait être identique à celui de l'autre séquence dans un cas sur deux. Entre les différentes sous-espèces de *Ln.mesenteroides* : *mesenteroides*, *cremoris* et *dextranicum*, les séquences des souches types, enregistrées sous les numéros d'accension respectifs CP000414, AB023247 et AB023246 étaient identiques.

Localisation des régions variables de l'ADNr 16S

Dans cette étape de l'identification des régions variables, le nombre de séquences examinées a été limité à une séquence par espèce. Seul un opéron de *Lb. acidophilus* et un opéron de *Lb. brevis*, identifiés par les numéros de séquence 155 et 169 respectivement, ont été pris en compte. De même, seule la séquence de la sous-espèce représentative de l'espèce au niveau de la souche type a été retenue. Les séquences de *Lb. helveticus*, de *Lb. rhamnosus* et de *Lb. fermentum* ont par ailleurs été écartées : d'une longueur d'environ 500 pb, les séquences de *Lb. helveticus* et de *Lb. rhamnosus* couvraient environ le tiers de la molécule et auraient dès lors faussé l'analyse de répartition des différences dans l'entièreté de la molécule, tandis que la présence d'un nombre élevé de nucléotides indéterminés dans la séquence de *Lb. fermentum* rendait difficile l'interprétation de la comparaison de séquences d'une telle longueur.

L'alignement des séquences sélectionnées (séquences indiquées par un astérisque, Tableau 3.3.1) a été effectué à l'aide de l'outil "Clustal W" de l'EBI (Thompson *et al.*, 1994). Les nucléotides des séquences alignées ont ensuite été examinés et leur variabilité déterminée en chacune de leurs positions successives. La variabilité des nucléotides en chacune des positions de l'alignement a été schématisée au fur et à mesure de sa détermination de façon à en visualiser le degré et la répartition dans la molécule d'ADNr 16S (Figure 3.3.1).

Entre les séquences de bactéries lactiques, les régions V1, V2 et V3 ainsi définies (Figure 3.3.1) présentaient un taux de variabilité des nucléotides de respectivement 238 %, 187 % et 209 % (paragraphe 2.4.3).

Détermination de l'applicabilité des régions variables à la différenciation des espèces

Le domaine d'application des régions V1, V2 et V3 en matière d'identification bactérienne a été déterminé de façon à inclure des séquences de toutes les espèces associées à des grains de kéfir qui ont été recensées dans le Tableau 1.1.1. La comparaison des séquences a dès lors été élargie aux séquences imparfaites de *Lb. helveticus*, de *Lb. rhamnosus* et de *Lb. fermentum* (Tableau 3.3.1). Elle incluait par ailleurs tous les opérons différents de *Lb. acidophilus* et de *Lb. brevis* et, pour les espèces comprenant plusieurs sous-espèces, toutes les séquences de leurs sous-espèces (Tableau 3.3.1).

Les régions variables ont été examinées par ordre décroissant de variabilité et en fonction de la pertinence de l'examen. La comparaison des séquences a été effectuée à partir de leur alignement.

L'alignement des régions V1 s'organisait en quatre groupes, distincts à la fois par la longueur des fragments et par la séquence des nucléotides (Figure 3.3.2).

Les séquences de la région V1 des lactobacilles se répartissaient dans deux groupes : un des groupes (groupe 1, Figure 3.3.2) comprenait les séquences des lactobacilles hétérofermentaires, facultatifs ou obligatoires, et d'un lactobacille homofermentaire, *Lb. gasseri* ; l'autre groupe (groupe 2, Figure 3.3.2) comprenait exclusivement les séquences de lactobacilles homofermentaires. Les séquences de la région V1 des coques lactiques et des leuconostocs s'ordonnaient dans des groupes distincts, spécifiques à chacun des groupes microbiens (groupes 3 et 4 respectivement, Figure 3.3.2).

Les séquences de la région V1 des lactobacilles se distinguaient de celles des coques lactiques et des leuconostocs notamment par la longueur des fragments : comprise entre 59 et 72 nucléotides pour les lactobacilles, la longueur des fragments était de 47 et 48 nucléotides respectivement pour les coques lactiques et les leuconostocs. Entre les coques lactiques et les leuconostocs, les séquences de la région V1 se distinguaient par les différences nucléotidiques. Entre ces deux groupes, les séquences différaient par au moins 17 nucléotides.

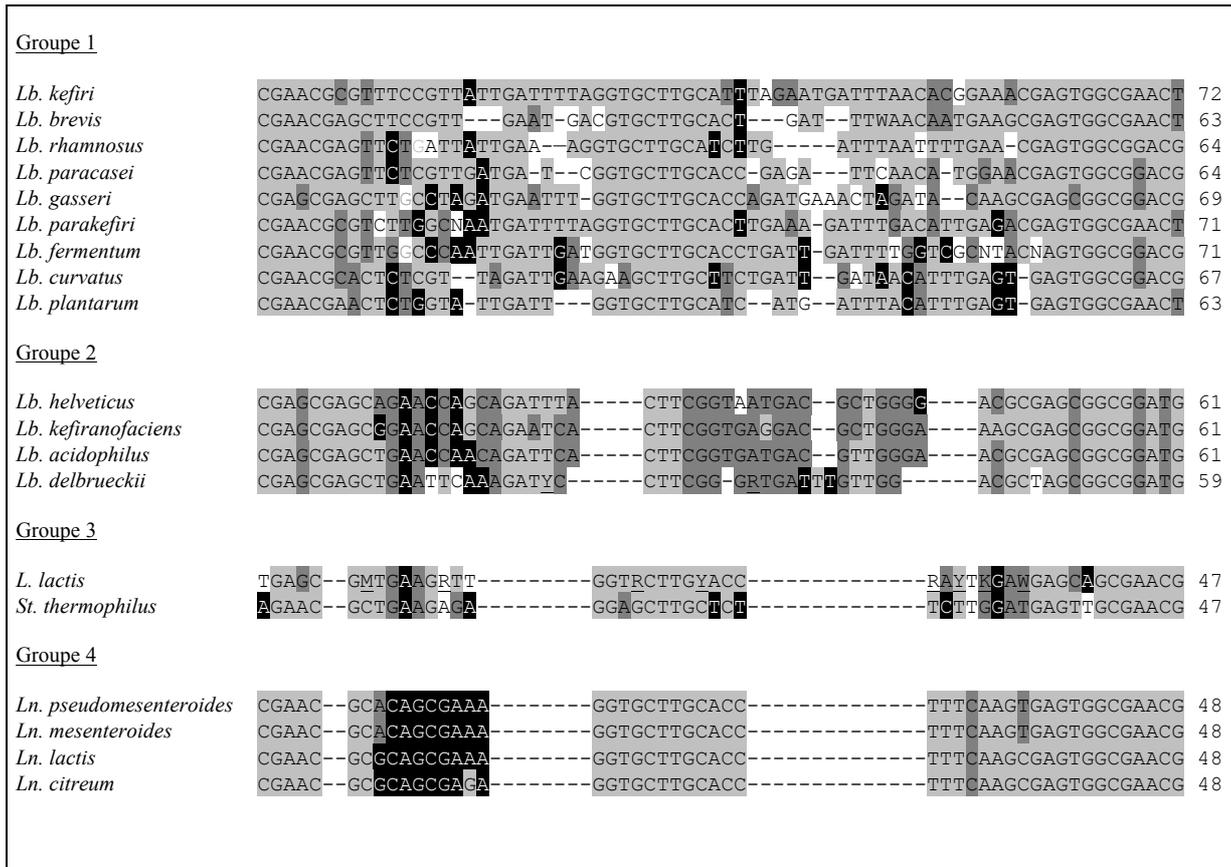


Figure 3.3.2 : Alignement de la région V1 de l'ADNr 16S de bactéries lactiques dont les numéros d'accès sont donnés dans le Tableau 3.3.1. Les séquences sont écrites dans le sens 5' → 3', avec, en marges, le nom de l'espèce dont elles sont issues et le nombre de nucléotides qu'elles comportent. Les séquences de certaines espèces incluent les séquences de plusieurs opérons ou sous-espèces pouvant comporter des différences nucléotidiques. Le cas échéant, les nucléotides différents sont identifiés par la lettre symbolique, soulignée, du code de l'Union internationale de biochimie (Cornish-Bowden, 1985) donné en Annexe II. A chaque position de la séquence, les nucléotides identiques sont indiqués par un même contraste monochrome entre le fond et le caractère.

Comparées deux à deux, au sein de chacun des groupes, les séquences de la région V1 présentaient des différences variables. Ces différences étaient plus fréquentes entre les séquences des lactobacilles hétérofermentaires et de *Lb. gasseri* (groupe 1, Figure 3.3.2) et entre celles des coques lactiques (groupe 3, Figure 3.3.2) qu'entre les séquences des lactobacilles homofermentaires autres que *Lb. gasseri* (groupe 2, Figure 3.3.2) et entre celles des leuconostocs (groupe 4, Figure 3.3.2).

Parmi les séquences des lactobacilles hétérofermentaires et de *Lb. gasseri*, les couples de séquences les plus proches provenaient de *Lb. kefir* et de *Lb. brevis* ou encore de *Lb. curvatus* et de *Lb. plantarum* ; les paires de séquences comportaient respectivement 17 et 18 nucléotides différents. Entre les séquences de *L. lactis* et de *St. thermophilus*, les différences concernaient au moins 11 nucléotides. Parmi les séquences de la région V1 des lactobacilles homofermentaires autres que *Lb. gasseri*, les couples de séquences les plus semblables provenaient de *Lb. acidophilus* et de *Lb. helveticus* ou *Lb. kefiranofaciens* ; ils comportaient chacun 6 nucléotides différents. Parmi les séquences des leuconostocs, celles de *Ln. mesenteroides* et de *Ln. pseudomesenteroides* étaient identiques.

La région V1 de l'ADNr 16S permettait de différencier entre elles les séquences des espèces appartenant aux deux groupes de lactobacilles et aux coques lactiques mais était inadéquate pour différencier celles appartenant aux leuconostocs. Des régions V2 et V3 de l'ADNr 16S, la plus appropriée à la différenciation des leuconostocs a été identifiée à partir de l'alignement de leurs séquences.

| <u>Alignement des régions V2</u> | |
|----------------------------------|---|
| <i>Ln. pseudomesenteroides</i> | CACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAACTCAGTGT |
| <i>Ln. mesenteroides</i> | CACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAACTTAGTGT |
| <i>Ln. citreum</i> | CACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAACTTAGTAT |
| <i>Ln. lactis</i> | CACGTGGATAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAACTTAGTAT |
| <i>Ln. pseudomesenteroides</i> | CGCATGACACAAAGTTAAAAGGCGCTTTGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGC 130 |
| <i>Ln. mesenteroides</i> | CGCATGACACAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGC 130 |
| <i>Ln. citreum</i> | CGCATGATATCAAGTTAAAAGGCGCTACGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGC 130 |
| <i>Ln. lactis</i> | CGCATGATACAAAGTTGAAAGGCGCTACGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGC 130 |
| <u>Alignement des régions V3</u> | |
| <i>Ln. pseudomesenteroides</i> | GCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGA 65 |
| <i>Ln. mesenteroides</i> | GCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGA 65 |
| <i>Ln. citreum</i> | GCACTGTTGTATGGGAAGAAATGCTAAAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGA 65 |
| <i>Ln. lactis</i> | GCACTGTTGTATGGGAAGAAATGCTAGAATAGGGAATGATTC TAGTTTGACGGTACCATAACCAGA 65 |

Figure 3.3.3 : Alignement des régions V2 et V3 de l'ADNr 16S de leuconostocs dont les numéros d'accèsion sont donnés dans le Tableau 3.3.1. Les séquences sont écrites dans le sens 5' → 3', avec, en marges, le nom de l'espèce dont elles sont issues et le nombre de nucléotides qu'elles comportent. A chaque position de la séquence, les nucléotides identiques sont indiqués par un même contraste monochrome entre le fond et le caractère.

L'alignement des régions V2 et V3 de séquences de l'ADNr 16S de leuconostocs montrait une plus grande variabilité des nucléotides au sein de la région V2 (Figure 3.3.3).

Selon la paire de séquences comparées, les différences affectaient respectivement de 2 à 7 nucléotides et de 1 à 5 nucléotides dans les régions V2 et V3.

3.3.2 Détermination des amorces d'amplification génique

Contrairement à la démarche classique d'identification microbienne qui consiste en l'examen d'isolats bactériens, celle appliquée aux bactéries lactiques du grain de kéfir KJ se voulait indépendante de cultures bactériennes. Elle visait l'ensemble de la population lactique du grain sans isolement préalable des différentes espèces sur des milieux de culture.

La présence, dans le grain KJ, de populations de bactéries lactiques de tailles très différentes en terme d'unités viables (paragraphe 3.2.2) imposait dès lors le recours à une stratégie permettant d'isoler l'ADNr 16S des populations minoritaires. Cet isolement a été réalisé par le biais d'amplifications séparées de leur ADNr 16S. Appliquée à la population dominante, les lactobacilles, la finalité de l'amplification génique était d'isoler l'ADNr 16S ciblé du plus large spectre possible d'espèces. Dans le cas des populations minoritaires, les coques lactiques et les leuconostocs, il s'agissait d'isoler l'ADNr 16S ciblé du plus large spectre possible d'espèces appartenant exclusivement à ces populations.

Deux amorces d'amplification génique ont été déterminées dans ce but à partir de l'alignement des séquences de bactéries lactiques (Tableau 3.3.1). Ces amorces ont été localisées et transcrites pour être utilisées avec l'amorce universelle 27F de Rochelle *et al.* (1992). Leur localisation a été déterminée de façon à inclure les régions variables V1 et V2 de l'ADNr 16S dans le fragment qu'elles délimitent avec l'amorce universelle 27F.

L'amorce commune aux lactobacilles (R350) était conservée dans toutes les séquences de lactobacilles, à l'exception de celles de *Lb. fermentum* et de *Lb. kefir* : elle différait d'un nucléotide par rapport à chacune de ces deux séquences. La différence dans les séquences portait respectivement sur la thymine de l'extrémité 5' de l'amorce et sur la cytosine de l'extrémité 3' de l'amorce. Dans le cas de *Lb. kefir*, la différence portait sur un nucléotide déterminant pour la fonctionnalité de l'amorce. Toutefois, d'une part, l'amorce était conservée dans d'autres séquences de la souche type de *Lb. kefir*, celles enregistrées sous les numéros d'accès AB024300 et AY579584, et, d'autre part, sa fonctionnalité a été vérifiée sur la souche type de *Lb. kefir*.

L'amorce spécifique aux coques et aux leuconostocs (R485) était conservée dans les séquences des espèces appartenant à ces groupes microbiens et comportait au moins deux nucléotides différents avec celles des lactobacilles.

La longueur des fragments ciblés a été calculée par rapport à l'ADNr 16S de *Escherichia coli* (Cilia *et al.*, 1996). Compte tenu de la position et de la longueur des amorces, qui est de 29 nucléotides pour la 27F (Rochelle *et al.*, 1992), la taille des fragments ciblés était de 380 pb et de 514 pb respectivement avec l'amorce R350 et R485 (Figure 3.3.4).

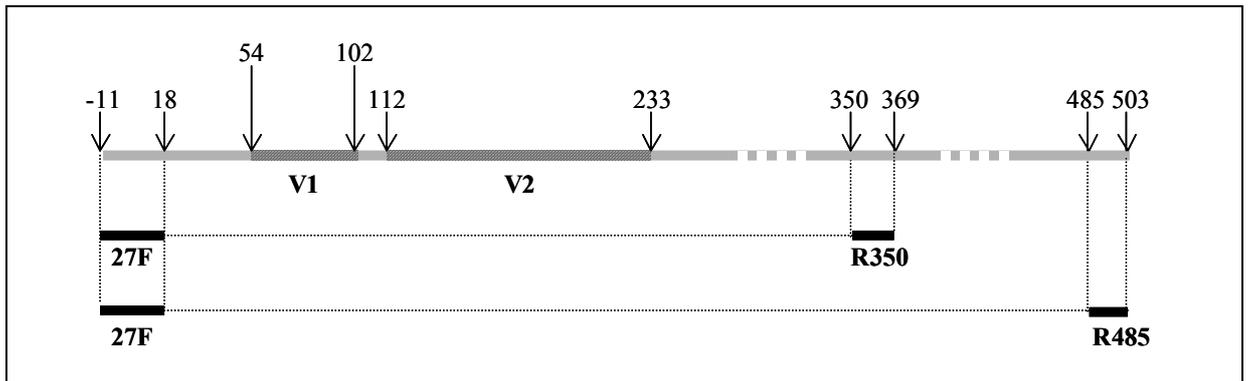


Figure 3.3.4 : Représentation schématique des fragments amplifiés avec l'amorce commune aux lactobacilles (R350), ou spécifique aux coques lactiques plus leuconostocs (R485), combinée avec l'amorce bactérienne universelle 27F décrite par Rochelle *et al.* (1992). Les régions variables V1 et V2 de l'ADNr 16S sont représentées par les zones hachurées. Les positions des nucléotides terminaux des régions variables et des amorces, dans l'ADNr 16S de *Escherichia coli* numéro d'accèsion X80725 (Cilia *et al.*, 1996), sont données par les nombres surmontant les flèches les pointant.

Appliquées aux souches types de diverses bactéries lactiques, les réactions d'amplification génique (PCR) ont donné les résultats attendus avec chacune des paires d'amorces. Avec la paire d'amorces prévue pour amplifier l'ADN des lactobacilles (27F-R350), les réactions de PCR exécutées sur *Lb. fermentum*, *Lb. kefir*, *Lb. johnsonii*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* et sur les deux sous-espèces de *Lb. kefiranofaciens* résultaient en fragments de la longueur attendue d'environ 380 pb. Avec la paire d'amorces prévue pour amplifier l'ADN des coques lactiques et des leuconostocs (27F-R485), les réactions de PCR exécutées sur *St. thermophilus*, *Ln. lactis*, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et sur les sous-espèces *cremoris* et *lactis* de *L. lactis* résultaient en fragments de la longueur attendue de

+/- 500 pb tandis qu'aucune amplification n'était observée quand elles étaient appliquées aux deux sous-espèces de *Lb. kefiranofaciens*.

3.3.3 Nombre de fragments analysés

Dans chacun des deux sets d'amplification, les fragments d'ADNr 16S provenant des diverses bactéries ont été isolés par clonage dans *E. coli*. Les fragments clonés ont ensuite été séquencés et analysés en nombres déterminés sur base des données disponibles relatives à la composition attendue de chacun des deux groupes bactériens amplifiés et à la contribution de leurs composantes au pool d'ADNr 16S. Le nombre de fragments à séquencer a ainsi été estimé en postulant l'hypothèse d'égale intensité d'amplification pour chacun des fragments présents dans le pool d'ADN génomique.

Chacun des groupes bactériens ciblés par les amorces d'amplification génique était potentiellement ou effectivement constitué de deux sous-groupes d'abondances inégales dans le grain en terme de bactéries viables : lactobacilles homofermentaires et hétérofermentaires pour les uns, coques lactiques et leuconostocs pour les autres. Les espèces homofermentaires représentent en effet jusqu'à 90 % des lactobacilles dans les grains de kéfir (Kandler & Kunath, 1983 ; Takizawa *et al.*, 1998) tandis que les leuconostocs étaient en moyenne 4 fois plus abondants dans le grain KJ que les coques lactiques.

L'équité de la contribution des unités bactériennes du grain au pool de matériel génomique à partir duquel elles étaient détectées supposait un rendement équivalent de l'extraction de leur ADN. L'hypothèse d'égalité des rendements d'extraction a été éprouvée sur les souches types de *Lactobacillus acidophilus*, de *Lb. casei*, de *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* et de *Lb. kefiri*. Appliquée à ces bactéries, la méthode d'extraction de l'ADN fournissait des quantités d'ADN proportionnelles au poids de leur culot cellulaire (Figure 3.3.5). Partant de ce constat, l'hypothèse d'égalité des rendements d'extraction de l'ADN a été étendue aux bactéries du grain.

En terme d'ADNr 16S, la contribution des différentes espèces du grain dépendait aussi du nombre de copies de leur ADNr 16S. Les espèces lactiques concernées par le sujet pour lesquelles cette information est connue portent entre 4 et 9 copies de l'ADNr 16S (Makarova *et al.*, 2006).

Dans les cas les plus défavorables, c'est-à-dire les moins abondants et les moins pourvus en copies d'ADNr 16S, les membres des lactobacilles et des coques plus leuconostocs représenteraient 4 % et 11 % de leur groupe respectif. Estimé en appliquant la loi binomiale, le nombre de fragments théoriquement nécessaire pour les détecter, avec une probabilité de 95 %, était respectivement de 73 et 25.

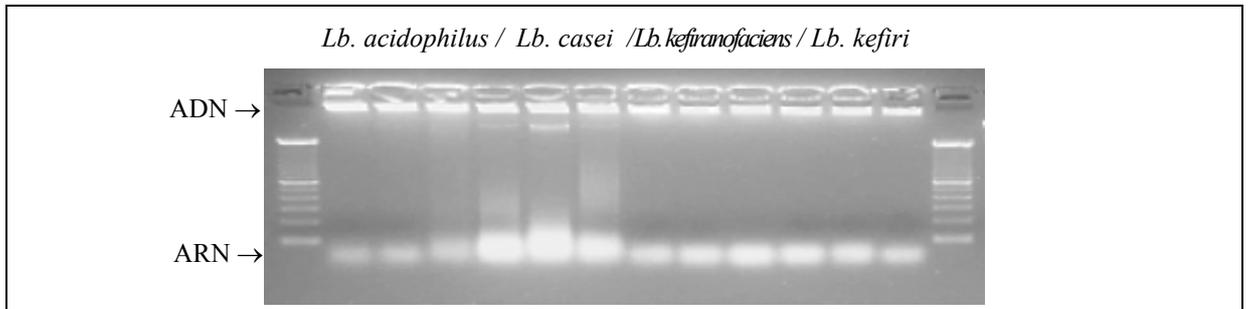


Figure 3.3.5 : Rendements de l'extraction de l'ADN génomique de *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* et *Lb. kefiri* en trois répétitions chacun. Migration en gel d'agarose de quantités d'extraits ajustés en fonction du poids des culots cellulaires.

En pratique, le nombre de fragments séquencés au sein des lactobacilles a été porté à 83 de façon à avoir au moins une répétition de chacune des séquences détectées. Dans le groupe des coques lactiques et des leuconostocs, trois exemplaires de la séquence appartenant au groupe le plus pauvre en terme de contribution au pool d'ADN et jamais représenté par plus d'un taxon au sein d'un grain, les leuconostocs (Tableau 1.1.1), a conduit à limiter l'analyse à 21 fragments.

3.3.4 Analyse des séquences

Les séquences de la microflore du grain de kéfir KJ ont été identifiées par comparaison avec celles d'une banque de données. Leur identification a été rationalisée en les regroupant préalablement en fonction des similarités de leur région V1.

Par le fait que les différences entre l'ADNr 16S des micro-organismes ne se répartissent pas uniformément au sein de la molécule (Neefs *et al.*, 1993), le seuil de nucléotides dissemblables, d'environ 1 %, proposé Stackebrandt & Ebers (2006) pour départir l'origine des séquences à des espèces différentes était inadéquat dans l'application présente. Parallèlement, même en envisageant la molécule entière de l'ADNr 16S, il n'y a pas de seuil

déterminé d'homologie des séquences à partir duquel elles peuvent être assignées à la même espèce (Stackebrandt & Goebel, 1994 ; Stackebrandt & Ebers, 2006). Le regroupement des séquences du grain de kéfir KJ et l'acceptabilité de leur identification moléculaire ont en conséquence été envisagés en fonction de la variabilité observée au sein de chacun des groupes microbiens ciblés.

Classement des séquences de la région V1 de l'ADNr 16S

Les séquences des 83 + 21 fragments ont été regroupées sur base des similarités de leur région V1 en cinq groupes : A, B, C, D et E (Figure 3.3.6).

Au sein des groupes A, C, D et E (Figure 3.3.6) les séquences étaient identiques ou différaient entre-elles par un nucléotide. Dans ces cas, l'assignation à une origine commune, même pour les séquences qui différaient d'un nucléotide, était supportée par le fait que, d'une part, au sein d'une même souche les copies de l'ADNr 16S ne sont pas nécessairement identiques (Vandamme *et al.*, 1996). Parmi les séquences de bactéries lactiques examinées, les opérons de *Lb. brevis* différaient d'un nucléotide dans la région V1. Et d'autre part, par le fait que la technique de PCR utilisée pour amplifier les fragments d'ADN peut générer des artefacts dans les séquences (Clarke *et al.*, 2001 ; Qiu *et al.*, 2001).

Trois séquences provenant du set d'amplification des lactobacilles présentaient entre elles des différences qui affectaient 2 ou 3 bases selon la paire considérée (groupe B, Figure 3.3.6). Dans la région V1, l'amplitude des différences entre les séquences de l'ADNr 16S des lactobacilles variait selon leur groupe fermentaire : elles affectaient 6 nucléotides entre la plupart des homofermentaires et plus de 17 nucléotides entre les hétérofermentaires. La séquence consensus déterminée à partir des trois séquences était assignée à un lactobacille hétérofermentaire, *Lactobacillus kefir*, c'est-à-dire à un membre du groupe des lactobacilles présentant le plus de variabilité dans la séquence de la région V1. L'origine commune des trois séquences était dès lors plausible.

Identification moléculaire des bactéries du grain à partir de la région V1

L'origine bactérienne des séquences a été établie en comparant les séquences consensus des groupes de similarité A, B, D et E (Figure 3.3.6), et les deux séquences du groupe C (Figure 3.3.6), à celles de l'EMBL à l'aide du moteur de recherche FASTA (Pearson & Lipman, 1988).

| Amplicons générés par la paire d'amorces 27F-R350 | |
|--|---|
| <u>Groupe A</u> (78 fragments): | |
| Consensus | 5'-CGAGCGAGCGGAACCAGCAGAATCACTTCGGTGAGGACGCTGGG AA AGCGAGCGGCCGATG-3' |
| 76x | 5'-.....-3' |
| 1x | 5'-..... G-3' |
| 1x | 5'-..... C-3' |
| <u>Groupe B</u> (3 fragments): | |
| Consensus | 5'-CGAACGCGTTTCCGTTATTGATTTTAGGTGCTTGCATTT AA ATGATTTAACACGAAACGAGTGGCGAACT-3' |
| 1x | 5'-..... A-3' |
| 1x | 5'-..... C-3' |
| 1x | 5'-..... G T-3' |
| <u>Groupe C</u> (2 fragments): | |
| 1x | 5'-CGAACGCGTCT T GGCCAATGATTTTCAGGTGCTTGCATTTGAAAGATTTGACATTGAGACGAGTGGCGAACT-3' |
| 1x | 5'-CGAACGCGTCTCGGCCAATGATTTTCAGGTGCTTGCATTTGAAAGATTTGACATTGAGACGAGTGGCGAACT-3' |
| Amplicons générés par la paire d'amorces 27F-R485 | |
| <u>Groupe D</u> (18 fragments): | |
| 18x | 5'-TGAGCGCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACG-3' |
| <u>Groupe E</u> (3 fragments): | |
| 3x | 5'-CGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACG-3' |

Figure 3.3.6 : Séquences de la région V1 de l'ADNr 16S de 83 + 21 fragments issus du grain de kéfir KJ, classées en groupes de similarité notés de A à E. Les séquences des groupes A, B et C comportaient des différences entre-elles ; les nucléotides différents sont indiqués en caractères gras tandis que les nucléotides identiques à ceux de la séquence consensus sont représentés par des points. La fréquence de chaque séquence est indiquée dans la marge de gauche. Les séquences ont été enregistrées dans la banque de l'EMBL sous les numéros d'accession AM419051, AM419054, AM419055, AM419056 et AM419052 respectivement pour les groupes A, B, C, D et E.

La séquence consensus du groupe A était identique à celles des souches types de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* et de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, enregistrées respectivement dans la banque de l'EMBL sous les numéros d'accession AJ575259 et AJ575261 (Vancanneyt *et al.*, 2004). Identique à celles des souches types de l'espèce, c'est-à-dire garantes de l'identité du groupe taxonomique, la séquence consensus du groupe A pouvait être attribuée sans ambiguïté à l'espèce *Lb. kefiranofaciens*.

La séquence consensus du groupe B était identique à celle d'une souche de *Lactobacillus kefiri* isolée à partir de fromage et enregistrée sous le numéro d'accession

DQ313162 (Florez *et al.*, 2006). Elle différait des séquences de la souche type enregistrées sous les numéros d'accèsion AB024300 et AJ621553 par la longueur du fragment : celles de la souche type comportaient respectivement 1 et 2 nucléotides additionnels, situés à l'intérieur de la séquence, par rapport à la séquence consensus du groupe B. Déterminée dans le cadre de ce travail, la séquence de la souche type de *Lactobacillus kefir*, enregistrée sous le numéro d'accèsion AM420309, concordait néanmoins en longueur et en séquence nucléotidique avec celle du groupe B et avec celle enregistrée sous le numéro d'accèsion DQ313162.

A défaut de séquence consensus, les deux séquences du groupe C ont été considérées individuellement. Elles s'alignaient toutes deux le mieux avec la séquence de la souche type de *Lactobacillus parakefir* enregistrée sous le numéro d'accèsion AY026750 (Kroneman *et al.*, 2002). Les deux séquences du groupe C en différaient néanmoins par 2 et 3 nucléotides respectivement. Toutefois, entre les membres du groupe des lactobacilles hétérofermentaires auquel appartient *Lb. parakefir*, les différences concernaient au moins 17 nucléotides (groupe 1, Figure 3.3.2). Par rapport à la variabilité de la région V1 observée entre les espèces hétérofermentaires, l'homologie des séquences du groupe C avec celle de la souche type permettaient d'accepter l'identification moléculaire de *Lb. parakefir*.

La séquence V1 du groupe D était identique à la séquence de la souche type de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* enregistrée sous le numéro d'accèsion AB100803 (Mori *et al.*, 2004). Les différences entre les séquences V1 des sous-espèces laitières *lactis* et *cremoris* de *L. lactis*, numéros d'accèsion AB100803 et AB100802 respectivement (Mori *et al.*, 2004), affectaient 8 nucléotides et autorisaient leur différenciation. Cependant la séquence V1 de la sous-espèce *lactis* ne différait de celle de la sous-espèce *hordniae*, numéro d'accèsion AB100804 (Mori *et al.*, 2004), que par 1 nucléotide et rendait incertaine l'identification de l'origine bactérienne du groupe D au niveau de la sous-espèce.

La séquence V1 du groupe E était identique à celles provenant de plusieurs espèces de *Leuconostoc* : notamment *Ln. mesenteroides*, *Ln. gelidium*, *Ln. inhae*, *Ln. pseudomesenteroides* et *Ln. carnosum*, numéros d'accèsion CP000414, AB004661, AY675244, AM491818 et AB022925 respectivement. Son origine a été assignée à ce genre bactérien.

Identification des leuconostocs à partir de la région V2 de l'ADNr 16S

La séquence de la région V1 ne permettant pas d'identifier les leuconostocs à un niveau plus précis que celui du genre, les régions V2 des trois fragments classés dans le groupe E sur base de leur région V1 ont été examinées.

Les trois fragments différaient d'une base dans la séquence de leur région V2 (Figure 3.3.7) et ont été considérés individuellement.

Alignées avec celles de la banque de données de l'EMBL, les séquences V2 du groupe E s'appariaient toutes les trois le mieux avec celle de la souche type de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et avec celle d'une souche de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, numéros d'accèsion CP000414 (Makarova *et al.*, 2006) et M23034 (Yang & Woese, 1989) respectivement.

Une des trois séquences issues du grain de kéfir KJ (n° 1 de la Figure 3.3.7) était identique aux deux séquences de référence tandis que les deux autres en différaient d'une base.

| | |
|----|---|
| 1: | 5' -CACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATA A CATTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTCGCATGACA |
| 2: | 5' -..... C |
| 3: | 5' -..... G |
| 1: | CAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGC-3' |
| 2: |-3' |
| 3: |-3' |

Figure 3.3.7 : Séquence de la région V2 de l'ADNr 16S des 3 fragments du groupe E. Les séquences des trois fragments différaient d'un nucléotide indiqué en caractère gras avec, en regard, le nucléotide de substitution. La séquence du groupe a été enregistrée dans la banque de l'EMBL sous le numéro d'accèsion AM419053.

Dans la région V2, les différences entre les séquences de *Ln. mesenteroides* et de *Ln. pseudomesenteroides* concernaient deux nucléotides (Figure 3.3.3), c'est-à-dire à peine un nucléotide de plus qu'entre les trois fragments issus du grain de kéfir KJ. Les différences entre les espèces étaient toutefois localisées en d'autres positions que celle du nucléotide qui variait entre les fragments issus du grain. En outre, l'espèce *Ln. pseudomesenteroides* n'a, à ma connaissance, jamais été isolée de grains de kéfir. Entre les séquences publiées des deux

leuconostocs associés à du kéfir, *Ln. mesenteroides* et *Ln. lactis*, les différences concernaient 6 nucléotides (Figure 3.3.3). Les trois fragments du groupe E ont dès lors été assignés à *Ln. mesenteroides* mais leur identification était incertaine.

3.4 Identification des isolats microbiens

L'approche indépendante d'isolements bactériens a permis d'identifier dans le grain KJ trois lactobacilles, un coque lactique et un leuconostoc. L'identification moléculaire était assurée au niveau taxonomique de l'espèce pour les lactobacilles et le coque lactique, et au niveau du genre pour le leuconostoc.

Les bactéries lactiques du grain ont été isolées en cultures pures pour confirmer et, le cas échéant, préciser leur identification moléculaire par une méthode phénotypique classique. Les autres groupes microbiens identifiés dans le grain, les bactéries acétiques et les levures, ont également été isolés du grain en cultures pures pour les identifier et ainsi compléter la caractérisation qualitative de la microflore du grain.

3.4.1 Isolement des souches microbiennes

Les lactobacilles ont été isolés du grain de kéfir KJ sur les milieux Rogosa-CW et KPL développés pour favoriser la croissance des lactobacilles spécifiques au kéfir et, en ce qui concerne le milieu KPL, plus particulièrement ceux produisant du kéfirane (Toba *et al.*, 1986 ; Kojima *et al.*, 1993).

Les colonies développées sur le milieu Rogosa-CW à partir du grain KJ ne présentaient pas de différences morphologiques permettant de les discriminer. Les isolats ont dès lors été sélectionnés par amplifications géniques effectuées à l'aide d'amorces spécifiques à chacune des espèces ciblées. Trois isolats ont été sélectionnés pour chacune des espèces ciblées, à l'exception de *Lb. parakefiri* pour lequel un unique isolat a été obtenu. La représentativité de *Lb. parakefiri* par un unique isolat résultait de la faible abondance des colonies développées sur le milieu Rogosa-CW répondant aux amorces spécifiques à cette espèce : une colonie sur les 54 testées donnait un signal positif à l'amplification génique spécifique.

Trois types distincts de colonies s'étaient développés sur le milieu KPL à partir du grain de kéfir KJ : des colonies bombées, blanches, et luisantes ; des colonies étalées,

translucides, légèrement blanchâtres et luisantes ; et une colonie blanche, opaque et matte. Trois colonies de chacun des types "luisants" et la colonie "matte" ont été examinées.

Les cultures bactériennes de coques lactiques, de leuconostocs, de levures et de bactéries acétiques ont été isolées du grain sur les milieux de culture sélectifs repris au Tableau 2.3.2. L'aspect uniforme de la morphologie des colonies développées sur les milieux sélectifs, ainsi que, pour les bactéries lactiques, les résultats de leur identification moléculaire, laissaient supposer que les coques lactiques, les leuconostocs, les bactéries acétiques et les levures étaient chacun représentés dans le grain de kéfir KJ par une espèce unique. Trois isolats de coques lactiques et de leuconostocs et un unique isolat de la bactérie acétique et de la levure ont été prélevés aléatoirement sur leur milieu de culture respectif.

3.4.2 Identification des isolats de lactobacilles

Les isolats présumés de lactobacilles, c'est-à-dire sélectionnés à partir des milieux Rogosa-CW et KPL, étaient tous Gram positifs, catalase négatifs et présentaient, sous un grossissement de 1000 X, une morphologie cellulaire en forme de bâtonnets.

Sélectionnés à partir du milieu Rogosa-CW, les isolats présumés de *Lb. kefiranofaciens* ne produisaient pas de CO₂ par fermentation du glucose (R-CW 64, R-CW 103 et R-CW 108, Tableau 3.4.1) tandis que les isolats présumés de *Lb. kefir* (R-CW 10, R-CW 22, R-CW 23, Tableau 3.4.2) et de *Lb. parakefiri* (R-CW 110, Tableau 3.4.2) en produisaient.

Sélectionnés à partir du milieu KPL, les isolats formant des colonies bombées, blanches, et luisantes (KPL 1, KPL 2 et KPL 4, Tableau 3.4.1) ainsi que l'isolat opaque et mat (KPL 9, Tableau 3.4.1) ne produisaient pas de CO₂ par fermentation du glucose tandis que les isolats formant des colonies étalées, translucides, légèrement blanchâtres et luisantes (KPL 6, KPL 7 et KPL 8, Tableau 3.4.2) en produisaient.

Les profils fermentaires des trois isolats présumés de *Lb. kefiranofaciens*, des trois isolats formant des colonies bombées, blanches et luisantes et de celui formant une colonie opaque et matte sur le milieu KPL (R-CW 64, R-CW 103, R-CW 108, KPL 1, KPL 2, KPL 4 et KPL 9, Tableau 3.4.1), étaient similaires. Un isolat formant des colonies bombées, blanches et luisantes sur le milieu KPL (KPL 1, Tableau 3.4.1) différait des autres par son incapacité à fermenter le N-acétyl-glucosamine tandis que l'isolat formant une colonie opaque et matte

sur le milieu KPL (KPL 9, Tableau 3.4.1) différait des autres par son incapacité à fermenter le D-raffinose. Le profil fermentaire des isolats, y compris la capacité variable de fermenter le N-acétyle-glucosamine, correspondait à celui de *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* décrit par Vancanneyt *et al.* (2004), à l'exception de la capacité de produire de l'acide à partir de D-mannose et, pour l'isolat "mat", de produire de l'acide à partir de D-raffinose. Ces auteurs décrivent *Lb. kefiranofaciens*, et sa sous-espèce *kefirgranum*, comme ne produisant pas d'acide à partir de D-mannose alors que les isolats du kéfir KJ en produisaient. Takizawa *et al.* (1994), qui avaient isolé, décrit et classé cette nouvelle bactérie au rang de l'espèce *Lb. kefirgranum*, lui attribuent par contre aussi la propriété d'utiliser le D-mannose. Dans nos laboratoires, la souche type du groupe, produisait effectivement de l'acide à partir de D-mannose (T a1, Tableau 3.4.1). Au contraire de la description de *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* faite par Vancanneyt *et al.* (2004) et des autres isolats du kéfir KJ, l'isolat "mat" et la souche type du groupe (KPL 9 et T a1, Tableau 3.4.1) ne produisaient pas d'acide à partir de D-raffinose.

Les isolats du kéfir KJ identifiés comme appartenant à l'espèce *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* formaient deux types de colonies différentes par leur aspect : luisantes et matte. L'aspect luisant traduisait vraisemblablement une production d'exopolysaccharide qui était déficiente dans la colonie matte. L'instabilité génétique de la production de certains exopolysaccharides est une caractéristique connue et documentée dans le domaine laitier (Cerning, 1990). Au sein des lactobacilles, la coexistence de colonies d'une même origine bactérienne présentant des aspects lisse et rugueux est notamment rapportée par Suskovic *et al.* (2000).

Les trois isolats présumés de *Lb. kefir* (R-CW 10, R-CW 22 et R-CW 23, Tableau 3.4.2) et les trois isolats formant des colonies étalées, translucides, légèrement blanchâtres, et luisantes sur le milieu KPL (KPL 6, KPL 7 et KPL 8, Tableau 3.4.2) exprimaient des caractères fermentaires identiques à ceux décrits par Kandler & Kunath (1983) pour cette espèce, à l'exception de la capacité de produire de l'acide à partir de galactose et de raffinose. Au contraire de leur description, tous les isolats fermentaient le galactose et deux isolats sur six (R-CW 10 et R-CW 22, Tableau 3.4.2) fermentaient le raffinose. Dans les conditions expérimentales du laboratoire, la souche type de *Lb. kefir* fermentait aussi le galactose et le raffinose (T b, Tableau 3.4.2).

L'isolat présumé de *Lb. parakefiri* (R-CW 110, Tableau 3.4.2) exprimait des caractères fermentaires qui concordaient à ceux décrit par Takizawa *et al.* (1994) pour *Lb. parakefiri* et, pour les caractères faisant défaut dans la description (Réf. c, Tableau 3.4.2), à ceux exprimés par la souche type de *Lb. parakefiri* (T c, Tableau 3.4.2).

3.4.3 Identification des isolats de coques lactiques

Les isolats présumés de lactocoques étaient Gram positifs et catalase négatifs. Observées sous un grossissement de 1000 X, les cellules bactériennes étaient isolées ou assemblées par paires ou en chaînes et présentaient une morphologie cellulaire de forme sphérique.

Les trois isolats présumés de lactocoques (RM 31, RM 38 et RM 41, Tableau 3.4.3) ne produisaient pas de CO₂ par fermentation du glucose. Leurs profils fermentaires étaient identiques et correspondaient à la description de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Schleifer *et al.*, 1985) à l'exception de la capacité de fermenter le tréhalose. Selon sa description, et comme cela s'était vérifié pour la souche type, cette bactérie fermente le tréhalose alors que les isolats du kéfir KJ en étaient incapables. Toutefois, tels les isolats du kéfir KJ, les 13 souches environnementales ou commerciales de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, isolées et identifiées par Urbach *et al.* (1997) par une approche polyphasique incluant l'analyse des gènes de l'ARNr 16S et *ldh*, ne produisent pas d'acide à partir de tréhalose.

3.4.4 Identification des isolats de leuconostoc

Les isolats présumés de leuconostoc étaient Gram positifs et catalase négatifs. Observées sous un grossissement de 1000 X, les cellules bactériennes étaient isolées ou assemblées, par paires ou en chaînes, et présentaient une morphologie cellulaire de forme sphérique.

Les trois isolats présumés de leuconostocs (RM 1, RM 2 et RM 3, Tableau 3.4.3) produisaient du CO₂ par fermentation du glucose.

La morphologie des cellules et la voie fermentaire des isolats confirmaient leur appartenance présumée au genre *Leuconostoc*. Les leuconostocs sont, avec certains lactobacilles, dont les isolats se distinguaient ici clairement par la morphologie des cellules, les seules bactéries lactiques hétérofermentaires (Garvie *et al.*, 1984).

Tableau 3.4.1 : Profils fermentaires des lactobacilles homofermentaires isolés du grain de kéfir KJ (R-CW et KPL). Le profil fermentaire de la souche type (T a1) du taxon assigné aux isolats KJ ainsi que ceux déduits de la description bibliographique du taxon (Réf. a1) et du taxon apparenté (Réf. a2) sont juxtaposés aux profils des isolats KJ.

| Test fermentaire | Isolat, souche type ou description bibliographique | | | | | | | | Réf. a1 | Réf. a2 |
|-------------------------------|--|-------------|-------------|----------|----------|----------|----------|------|------------|------------|
| | R-CW 64 | R-CW 103 | R-CW 108 | KPL 1 | KPL 2 | KPL 4 | KPL 9 | T a1 | | |
| Dégagement de CO ₂ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hydrolyse de l'esculine | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| Glycérol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Erythritol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Arabinose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Arabinose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ribose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Xylose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Xylose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Adonitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Méthyle-D-xyloside | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Galactose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Glucose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Fructose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Mannose | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| L-Sorbose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rhamnose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Dulcitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Inositol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mannitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sorbitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Méthyle-D-mannoside | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Méthyle-D-glucoside | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| N-Acétyle-glucosamine | + | + | + | - | + | + | + | + | v | v |
| Amygdaline | - | - | - | - | - | - | - | + | v | - |
| Arbutine | + | + | + | f | f | f | + | + | v | - |
| Salicine | + | + | + | + | f | + | + | + | + | - |
| Cellobiose | - | - | - | - | - | - | - | + | v | - |
| Maltose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | v |
| Lactose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Melibiose | + | + | + | + | + | + | + | f | + | v |
| Saccharose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tréhalose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Inuline | - | - | - | - | - | - | - | - | v | - |
| Mélézitose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Raffinose | + | + | + | + | + | + | - | - | + | v |
| Amidon | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Glycogène | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Xylitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gentiobiose | - | - | - | - | - | - | - | + | v | - |
| D-Turanose | - | - | - | - | - | - | - | f | v | - |
| D-Lyxose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Tagatose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Fucose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Fucose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Arabitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Arabitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gluconate | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2-céto-gluconate | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5-céto-gluconate | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

f : faible réaction ; v : variable selon la souche ; a1 : *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* (Vancanneyt *et al.*, 2004) ; a2 : *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* (Vancanneyt *et al.*, 2004).

Tableau 3.4.2 : Profils fermentaires des lactobacilles hétérofermentaires isolés du grain de kéfir KJ (R-CW et KPL). Les profils fermentaires des souches types (T b et T c) des taxons assignés aux isolats KJ ainsi que ceux déduits de leur description bibliographique (Réf. b et Réf. c) sont juxtaposés aux profils des isolats KJ.

| Test fermentaire | Isolat, souche type ou description bibliographique | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|--|---------|---------|-------|-------|-------|-----|--------|----------|-----|--------|
| | R-CW 10 | R-CW 22 | R-CW 23 | KPL 6 | KPL 7 | KPL 8 | T b | Réf. b | R-CW 110 | T c | Réf. c |
| Dégagement de CO ₂ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Hydrolyse de l'esculine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Glycérol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Erythritol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Arabinose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Arabinose | + | + | + | + | f | + | + | v | + | + | + |
| Ribose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Xylose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Xylose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Adonitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Méthyle-D-xyloside | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Galactose | + | + | + | + | + | f | + | - | + | + | + |
| D-Glucose | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| D-Fructose | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| D-Mannose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Sorbose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rhamnose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Dulcitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Inositol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mannitol | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Sorbitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Méthyle-D-mannoside | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Méthyle-D-glucoside | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| N-Acétyle-glucosamine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Amygdaline | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arbutine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Salicine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cellbiose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Maltose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Lactose | + | + | + | + | + | f | + | + | + | + | + |
| Melibiose | + | + | + | + | + | f | + | + | - | + | v |
| Saccharose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Tréhalose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Inuline | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mélézitose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | v |
| D-Raffinose | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Amidon | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Glycogène | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Xylitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gentiobiose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Turanose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Lyxose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Tagatose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Fucose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Fucose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Arabitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Arabitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gluconate | + | + | + | + | + | + | f | + | - | - | - |
| 2-céto-gluconate | f | f | f | f | f | f | f | - | - | - | - |
| 5-céto-gluconate | - | f | - | - | - | - | f | - | - | - | - |

f : faible réaction ; v : variable selon la souche ; b : *Lactobacillus kefir* (Kandler & Kunath, 1983) ; c : *Lactobacillus parakefir* (Takizawa *et al.*, 1994).

Tableau 3.4.3 : Profils fermentaires des coques lactiques et des leuconostocs isolés du grain de kéfir KJ (RM). Le profil fermentaire de la souche type (T d) du taxon assigné aux coques lactiques isolés du grain, celui déduit de sa description bibliographique (Réf. d) et ceux de divers leuconostocs (Réf. e1, Réf. e2 et Réf. e3) sont juxtaposés aux profils des isolats KJ.

| Test fermentaire | Isolat, souche type ou description bibliographique | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|--|----------|----------|--------|----------------|---------|---------|----------------|------------|------------|----------------|
| | RM 31 | RM 38 | RM 41 | T d | Réf. d | RM 1 | RM 2 | RM 3 | Réf. e1 | Réf. e2 | Réf. e3 |
| Dégagement de CO ₂ | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| Hydrolyse de l'esculine | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | v |
| Glycérol | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Erythritol | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| D-Arabinose | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| L-Arabinose | - | - | - | - | - | - | - | - | v | - | - |
| Ribose | + | + | + | + | + | - | - | - | | | |
| D-Xylose | + | + | + | + | V _r | - | + | + | - | - | V _r |
| L-Xylose | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Adonitol | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Méthyle-D-xyloside | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Galactose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | v |
| D-Glucose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Fructose | + | + | + | + | + | - | - | - | v | - | v |
| D-Mannose | + | + | + | + | + | - | - | - | v | - | + |
| L-Sorbose | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Rhamnose | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Dulcitol | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Inositol | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Mannitol | - | - | - | - | V _r | - | - | - | - | - | v |
| Sorbitol | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Méthyle-D-mannoside | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Méthyle-D-glucoside | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| N-Acétyle-glucosamine | + | + | + | + | + | + | + | + | | | |
| Amygdaline | f | f | f | f | V _r | - | - | - | - | - | V _r |
| Arbutine | + | + | + | + | v | - | - | - | | | |
| Salicine | + | + | + | + | v | - | - | - | - | - | v |
| Cellobiose | + | + | + | + | v | - | - | - | - | - | v |
| Maltose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | v |
| Lactose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | V _r |
| Melibiose | - | - | - | - | - | - | - | - | v | - | V _r |
| Saccharose | - | - | - | - | V _r | + | f | V _r | v | - | v |
| Tréhalose | - | - | - | + | + | - | - | - | v | - | + |
| Inuline | - | - | - | - | V _r | - | - | - | | | |
| Mélézitose | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| D-Raffinose | - | - | - | - | - | - | - | - | v | - | V _r |
| Amidon | - | - | - | - | V _r | - | - | - | | | |
| Glycogène | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Xylitol | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Gentiobiose | + | + | + | + | v | - | - | - | | | |
| D-Turanose | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| D-Lyxose | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| D-Tagatose | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| D-Fucose | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| L-Fucose | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| D-Arabitol | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| L-Arabitol | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| Gluconate | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| 2-céto-gluconate | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| 5-céto-gluconate | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |

f : faible réaction ; v : variable selon la souche ; vr : réaction variable ; d : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Schleifer *et al.*, 1985) ; e1, e2, e3 : *Leuconostoc lactis*, *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* et *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* respectivement (Garvie, 1984).

Les profils fermentaires des trois isolats de *Leuconostoc* différaient entre eux par la capacité de fermenter le D-xylose : deux isolats (RM 2 et RM 3, Tableau 3.4.3) fermentaient le D-xylose et un isolat (RM 1, Tableau 3.4.3) ne le fermentait pas. Parallèlement, l'acidification du milieu à partir de saccharose était variable : franche pour un des isolats (RM 1, Tableau 3.4.3), elle était faible pour les deux autres (RM 2 et RM 3, Tableau 3.4.3). Lorsque le test a été répété plus tard pour l'un d'eux (RM 3), la réaction qui était antérieurement faible, devenait franchement négative. D'après les résultats de Garvie *et al.* (1984), une variabilité de réponse à un test fermentaire entre souches d'une même espèce et une variabilité de réaction à un test fermentaire sont fréquentes chez certains *Leuconostoc* et en particulier chez *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Réf. e3, Tableau 3.4.3). Par cette caractéristique, les isolats du kéfir KJ s'apparentaient à *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ; ils s'en écartaient cependant par leur incapacité à fermenter le tréhalose et par le petit nombre de sucres fermentés. Ces propriétés là, les rapprochaient de *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* (Réf. e2, Tableau 3.4.3) ou plus encore de *Ln. lactis* (Réf. e1, Tableau 3.4.3). Les trois isolats en différaient néanmoins par leur capacité d'hydrolyser l'esculine. Les profils fermentaires des trois isolats ne permettaient en conséquence pas de préciser l'identification du *Leuconostoc* sp. issu du grain KJ au niveau de l'espèce.

L'identification du *Leuconostoc* sp. issu du grain KJ a été précisée par l'analyse du profil de migration des protéines cellulaires d'un isolat. Le profil de migration des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) de l'isolat RM 3 était le plus similaire à ceux de diverses souches de *Leuconostoc mesenteroides*, dont celui de la souche type du groupe (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, Figure 3.4.1), et permettait d'attribuer l'appartenance de l'isolat RM 3 à *Leuconostoc mesenteroides*.

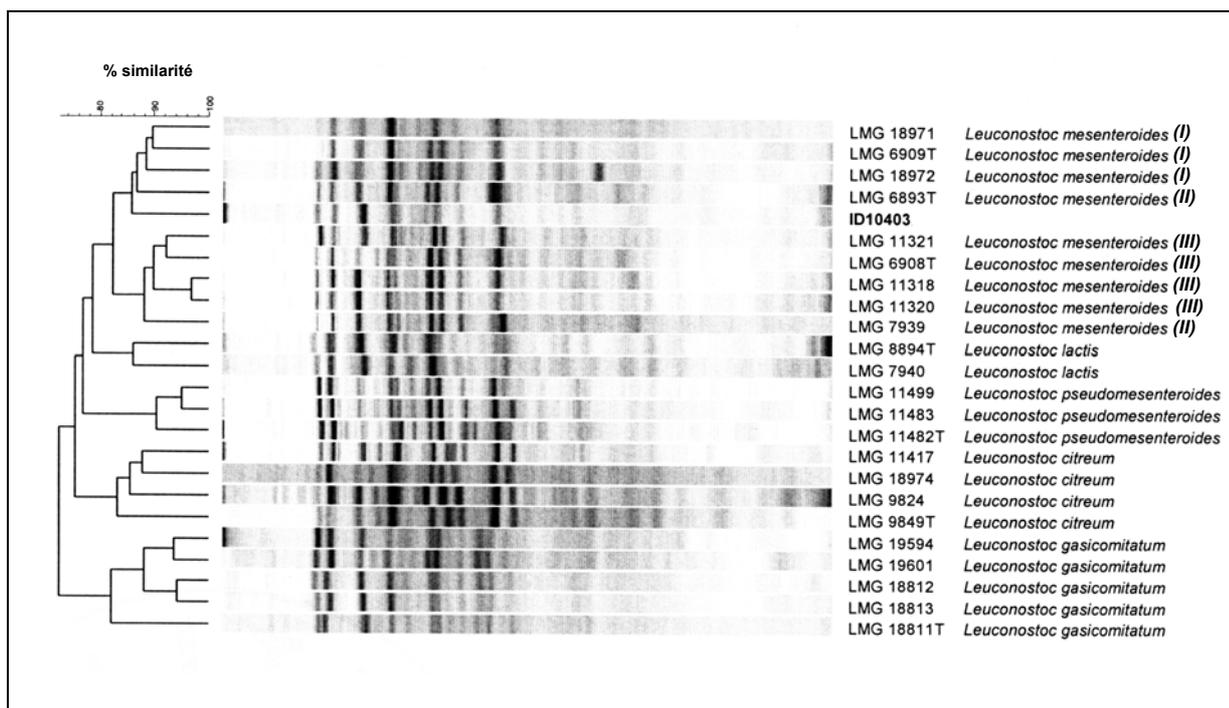


Figure 3.4.1 : Comparaison du profil de migration des protéines, par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), de la souche isolée du kéfir KJ avec les profils de souches de leuconostocs provenant du Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (Gand, Belgique). Les souches à l'origine des profils sont identifiées dans la marge de droite ; la souche isolée du kéfir KJ est identifiée sous le numéro ID10403 tandis que celles provenant de la collection sont identifiées par leur numéro de référence, complété par la lettre T pour les souches types. Les sous-espèces de *Leuconostoc mesenteroides* sont respectivement : (I) *cremoris*, (II) *mesenteroides* et (III) *dextranicum*. Le degré de similarité entre les profils est représenté par le dendrogramme donné dans la marge de gauche.

3.4.5 Identification de l'isolat acétique

L'identification de l'isolat acétique était exclusivement basée sur l'analyse d'une séquence partielle de l'ADNr 16S d'une longueur de 801 nucléotides. Les nucléotides terminaux de la séquence correspondaient aux 19^{ième} et 874^{ième} nucléotides de l'ADNr 16S de *E. coli* numéro d'accèsion X80725 (Cilia *et al.*, 1996).

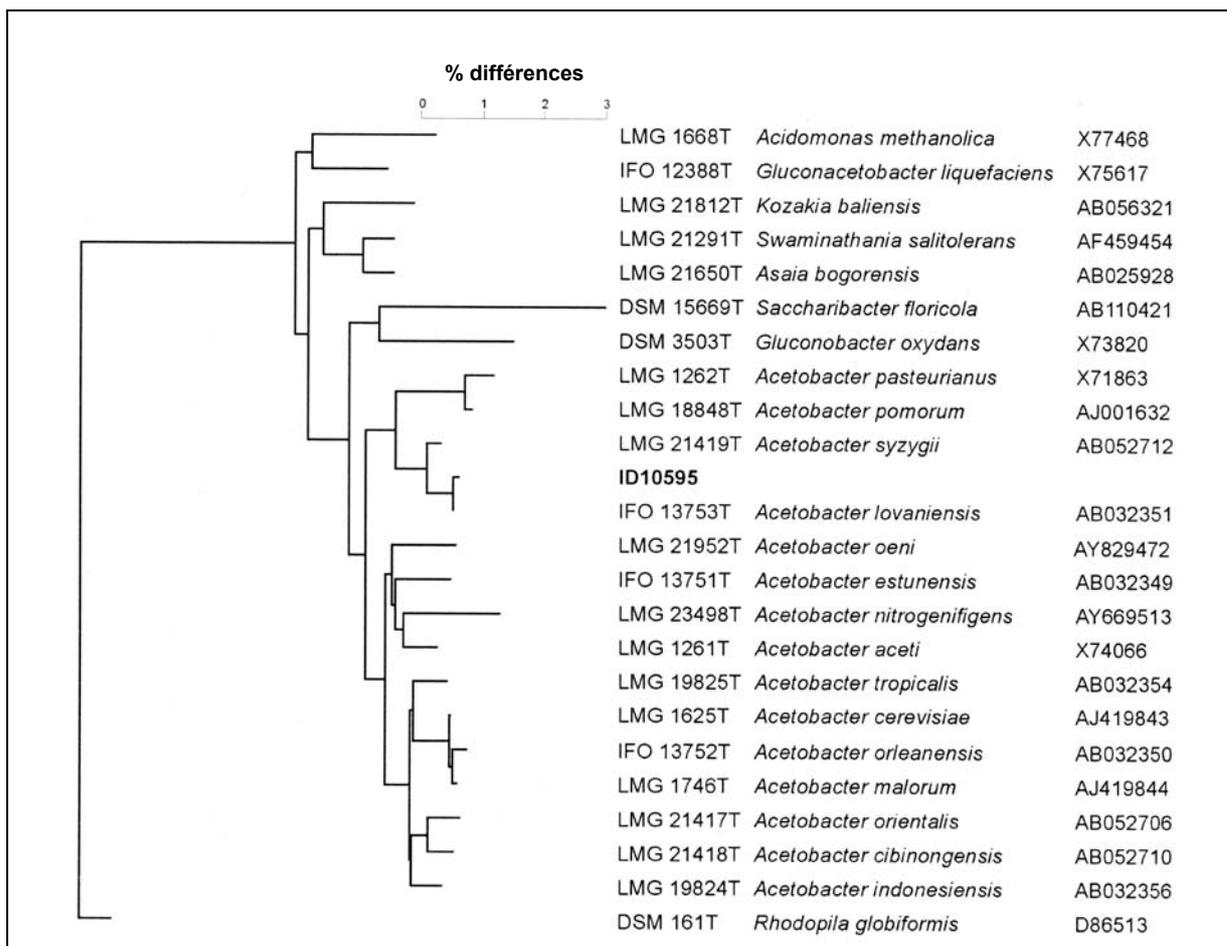


Figure 3.4.2 : Arbre phylogénétique établi à partir de la séquence partielle de l'ADNr 16S de l'isolat du kéfir KJ et des souches types de diverses espèces acétiques. Les souches à l'origine des séquences sont identifiées dans la marge de droite ; celle isolée du kéfir KJ est identifiée sous le numéro ID10595. Les numéros d'accèsion des séquences des souches types sont donnés à l'extrême droite. La distance entre les séquences, en terme de différences nucléotidiques, est représentée par la longueur des "branches" de l'arbre représenté dans la marge de gauche.

La séquence partielle de l'isolat a été comparée, par alignement, avec les séquences provenant de la banque de données de l'EMBL dont les numéros d'accèsion sont indiqués dans la Figure 3.4.2. Déterminée à partir de ces comparaisons, la position phylogénétique de la séquence partielle de l'ADNr 16S permettait d'attribuer sans ambiguïté l'appartenance de l'isolat au genre *Acetobacter* (Figure 3.4.2).

La séquence partielle de l'isolat présentait le plus de similarité avec la séquence de la souche type de *Acetobacter lovaniensis*. La proportion de nucléotides identiques entre ces

deux séquences atteignait 99,9 % et indiquait que l'isolat appartenait très probablement à cette espèce. Toutefois, le manque de précision quant à la variabilité de cette région de l'ADNr 16S entre les différentes espèces constitutives de ce groupe bactérien, les *Acetobacter*, ne permet pas de garantir l'identification au niveau de l'espèce.

L'isolat acétique a été déposé en collection publique (BCCM/LMG Bacteria Collection, Gand, Belgique) sous la référence LMG 24630.

3.4.6 Identification de l'isolat de levure

Observé sous un grossissement de 1000 X, la levure isolée du kéfir KJ se présentait sous la forme de cellules allongées, non filamenteuses et bourgeonnantes.

L'isolat fermentait le glucose, le galactose, le saccharose, le tréhalose et le raffinose. Il était doté d'une activité N-acétyl- β -glucosamidase mais était dépourvu d'activité β -maltosidase, α -amylase, β -xylosidase, β -glucuronidase, uréase et β -galactosidase.

La table d'identification fournie par le fournisseur du test appliqué ne permettait pas d'identifier la levure isolée du kéfir KJ. Le test est conçu pour identifier des levures cliniques et non alimentaires et, sans surprise, aucun des profils proposés ne correspondait à celui de l'isolat. Elle permettait toutefois d'orienter l'identification vers un membre du genre *Saccharomyces* ou *Candida*. Comparé à la description des espèces de *Saccharomyces* et de *Candida* constitutives de grains de kéfir (Tableau 1.1.1), le profil de l'isolat correspondait à celle de *Saccharomyces exiguus* (Barnett *et al.*, 2000) aujourd'hui renommée *Kazachstania exigua* sur une base moléculaire (Kurtzman, 2003).

L'identification de l'isolat en tant que *Kazachstania exigua* a été confirmée par la Mycothèque de l'université catholique de Louvain (MUCL ; Louvain-la-Neuve, Belgique) sur base de caractéristiques morphologiques et physiologiques et sur base de la séquence de l'ADNr 26S de l'isolat.

L'isolat de levure a été déposé en collection publique (BCCM/MUCL (Agro)Industrial Fungi & Yeasts Collection, Louvain-le Neuve, Belgique) sous la référence MUCL 49750.

3.5 Formation du grain de kéfir KJ

La formation *in vitro* d'un grain de kéfir est un défi clairement exprimé (Koroleva, 1988 ; Zourari & Anifantakis, 1988 ; Libudzisz & Piatkiewicz, 1990). Aucune tentative de reconstitution d'un grain de kéfir n'est, à ma connaissance, décrite, laissant comme base de réflexion expérimentale les descriptions de formation de grains *in situ*.

3.5.1 Concepts sous-tendant les essais de reconstitution du grain

Dans sa description, Beijerinck (1889²⁶) localise la formation des grains sur les parois des conteneurs de fermentation du kéfir. Il précise par ailleurs que ces conteneurs n'étaient "jamais" nettoyés. Indirectement cette absence de nettoyage laissait penser que du caillé ait pu s'accumuler sur les parois et être le siège de la formation des grains. Cette hypothèse concordait avec la description plus précise faite par Lacrosse (1981). Cet auteur décrit explicitement la formation d'une "croûte caséuse comprenant un agglomérat de micro-organismes vivants" sur les parois des conteneurs et y associe la naissance des grains. D'après les observations rapportées par Lacrosse (1981), "cette croûte spongieuse aurait, après dessiccation et morcellement, donné naissance aux grains originaux de kéfir"....

Par le biais de sa description de la genèse de la croûte spongieuse, décrite comme provenant des "caillages successifs", Lacrosse (1981) précise la nature de la croûte spongieuse à l'origine des grains, du caillé, et exprime une notion d'événements répétés. Cette notion d'événements répétés laissait penser que les grains se forment progressivement dans le caillé préservé au cours des fermentations successives.

3.5.2 Essais de reconstitution du grain à partir du consortium microbien extrait du grain

Deux essais de reconstitution du grain ont été conçus sur base de ces descriptions de formation de grains *in situ*. Dans chacun des deux essais, du caillé primaire, c'est-à-dire de première fermentation, a été préservé au cours des renouvellements de lait. Un des essais a été mis en place avec du caillé primaire frais, tandis que l'autre a été mis en place avec du caillé primaire séché.

²⁶ Beijerinck M.W., 1889. Sur le kéfir. *Arch. Néerl. Sci. Exactes Nat.* **23**, 428-444. Cité par : Pidoux, 1984.

Le caillé primaire a été formé à partir du consortium extrait du grain de kéfir KJ en prenant soin de ne pas le mettre en contact avec du métal. Sans preuve scientifique formelle de l'effet négatif du métal sur le développement des grains, il a été tenu compte d'une recommandation formulée notamment par Libudzisz & Piatkiewicz (1990).

La fermentation du lait à partir de ces extraits de grain conduisait à la formation d'un gel ferme au terme de 2 semaines d'incubation à température ambiante. La consistance du gel permettait de l'immerger dans du lait sans qu'il s'y disperse et ainsi de le préserver. Les portions de caillé primaire frais mises en oeuvre dans l'essai ont été prélevées dans des gels formés, en boîtes de Petri, autour de copeaux de bois. Les copeaux de bois avaient une double fonction : d'une part, simulant les parois des barriques de bois décrits par Beijerinck (1889²⁷), ils fournissaient un support d'accroche permanent aux structures de grain en formation et, d'autre part, ils permettaient de localiser le caillé primaire frais au cours des transferts successifs dans du lait. Le caillé primaire séché provenait de gels formés en boîte de Petri, sans copeaux de bois, et séchés à température ambiante pendant 20 jours. Transférés dans du lait, les fragments séchés ramollissaient au cours du temps mais restaient repérables jusqu'au terme de l'essai.

Six portions de caillé frais et 6 fragments de caillé séchés de 1 à 2 cm², répartis chacun respectivement dans 3 et 2 boîtes de Petri, ont été conservés au cours de l'essai.

Cycles de culture

Le schéma expérimental adopté, fermentation en boîte de Petri sans dispersion du caillé, conduisait à une fermentation locale du lait : le lait prenait en masse excentriquement à partir des caillés. Lorsque, à la faveur de la prise en masse du lait, l'adhérence des caillés au fond de la boîte le permettait, les caillés étaient mouillés avec le lait resté liquide en inclinant la boîte. Le lait était renouvelé lorsqu'il n'en restait plus assez pour mouiller les caillés, c'est-à-dire après 1 à 2 semaines d'incubation à température ambiante et en aérobiose.

²⁷ Beijerinck M.W., 1889. Sur le kéfir. *Arch. Néerl. Sci. Exactes Nat.* **23**, 428-444. Cité par : Pidoux, 1984.

Durée des essais

Dans l'hypothèse où les grains se forment par croissance de petites structures initiales, la durée des essais devait permettre à ces petites structures d'atteindre une taille détectable dans les caillés.

Considérant que la densité des grains est de 1 g.cm^{-3} , une structure initiale minimale de quelques dizaines de levures et de quelques centaines de lactobacilles aurait théoriquement, d'après la composition microbienne du grain KJ (paragraphe 3.2.2), une taille de l'ordre de $10^{-2} - 10^{-3} \text{ mm}^3$. La taille qu'elle devait atteindre pour être détectable dans les caillés avait été estimée à environ $5 \cdot 10^{-1} \text{ mm}^3$ (1 mm de diamètre). Elle s'avèrera plus tard amplement suffisante (Tableau 3.5.1).

Le rythme de croissance des petites structures de grain était indéterminé et a été extrapolé à partir de celui du grain mère. Cette extrapolation n'avait toutefois de sens que pour les petites structures dont l'environnement était comparable à celui du grain mère. C'était potentiellement le cas pour celles entraînées avec les fragments de caillé séché et situées à la surface de ceux-ci mais pas pour celles incluses dans les caillés.

Le rythme de croissance du grain mère de kéfir KJ variait en fonction du taux d'ensemencement du lait dans des proportions non négligeables du point de vue de l'estimation de la durée de l'essai : le grain mère doublait en 1 ou 2 semaines selon qu'il était ensemencé dans le lait à des taux de 5 % ou 20 % (p/v) respectivement (Ninane, 2002). A ces rythmes de croissance, la durée nécessaire à l'acquisition de la taille ciblée par les petites structures initiales était de 6 à 8 semaines ou de 12 à 16 semaines respectivement.

Pour préciser l'estimation, le taux d'ensemencement du lait par le caillé séché a été estimé par pesée d'échantillons indépendants de ceux mis en oeuvre pour l'essai. Le poids moyen du caillé séché était de $(0,027 \pm 0,002) \text{ g.cm}^2$, ce qui, pour 3 fragments ensemencés dans 20 ml de lait, équivalait à un taux approximatif de 1 % (p/v). Dans l'hypothèse où les petites structures initiales croissent au même rythme que le grain mère, une durée de 8 semaines était suffisante pour les détecter dans le caillé.

Structure des caillés au terme des essais

Au terme des 8 semaines d'expérimentation, les caillés primaires frais et séchés se dispersaient sous une pression mécanique et ne contenaient pas de structures fermes et élastiques détectables à l'aide d'une spatule.

3.5.3 Agglutination en milieux de synthèse du consortium microbien extrait du grain

Devant l'absence de formation de structures ressemblant à des grains, les propriétés agglutinantes du consortium microbien extrait du grain de kéfir KJ ont été examinées. Par sa provenance, le consortium extrait du grain possédait *a priori* les propriétés d'agglutination nécessaire à la formation de structures initiales mais on ne pouvait exclure qu'elles aient été affectées par l'action mécanique de dispersion du grain. Il s'agissait par ailleurs d'estimer la vitesse de formation de structures microbiennes.

Les propriétés d'agglutination du consortium extrait du grain KJ ont été examinées dans des bouillons de synthèse. Au contraire du lait fermenté, les bouillons de synthèse permettaient, par leur translucidité, l'examen visuel direct des structures microbiennes formées.

Après 2 semaines d'incubation, les cultures microbiennes développées à partir d'un extrait du grain KJ présentaient des aspects différents selon le bouillon utilisé et les conditions d'atmosphère appliquées (Figure 3.5.1).

En aérobiose, elles prenaient la forme d'un dépôt poudreux, sans cohésion, dans les bouillons M 17, Rogosa-CW et KPL (Figure 3.5.1, I). Dans le bouillon MRS_{5,4}, le dépôt microbien formait dans le fond des boîtes un film libre cohérent aux contours indépendants du bord de la boîte et qui se maintenait, sans dispersion poudreuse, lorsqu'on le faisait glisser en inclinant légèrement la boîte (Figure 3.5.1, I). Des petites structures indépendantes flottaient à la surface des bouillons MRS_{5,4}, Rogosa-CW et KPL ; elles prenaient la forme de peaux dans les bouillons MRS_{5,4} et Rogosa-CW, et d'amas floconneux dans le bouillon KPL.

En anaérobiose, le dépôt cellulaire prenait la forme d'un film cohérent libre dans les bouillons M 17, MRS_{5,4} et Rogosa-CW. Ces biofilms se brisaient sous agitation tout en conservant une structure agglomérée (Figure 3.5.1, II). Dans le bouillon KPL, le

développement microbien se présentait sous la forme d'un amoncellement d'amas floconneux (Figure 3.5.1, II).

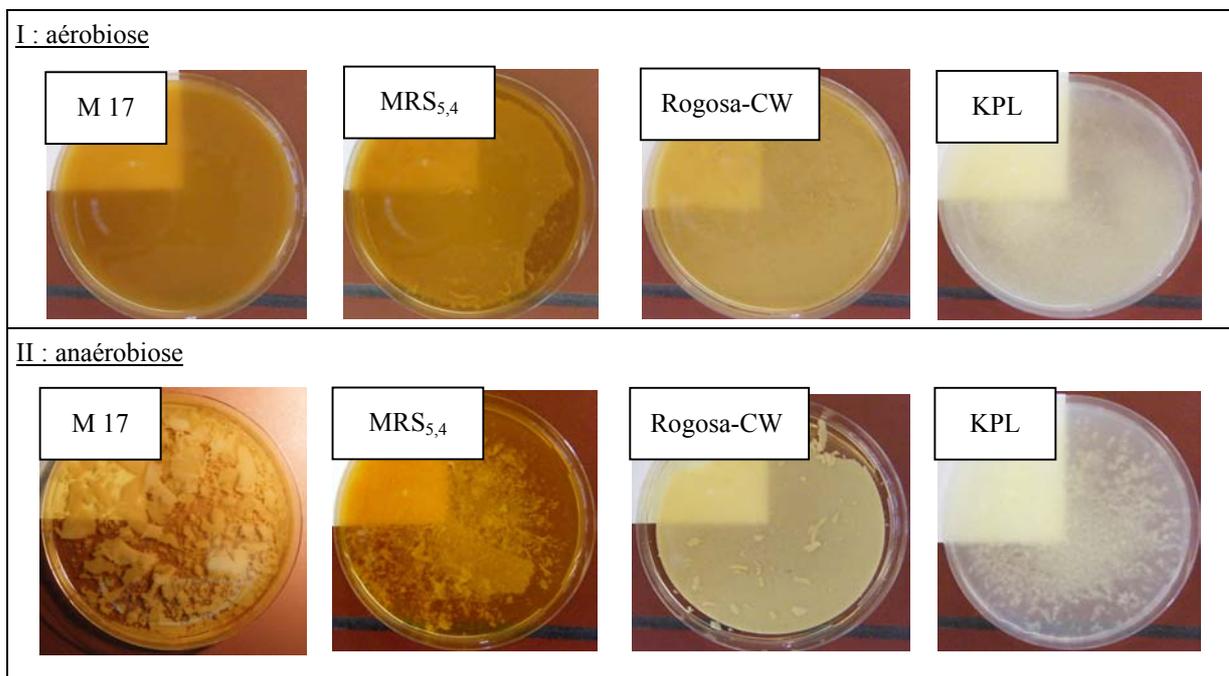


Figure 3.5.1 : Structure des cultures microbiennes développées après 2 semaines d'incubation en aérobie (I) et en anaérobie (II) dans les bouillons M 17, MRS_{5,4}, Rogosa-CW et KPL à partir d'un extrait du grain KJ. Les biofilms formés dans le fond des boîtes de Petri ont été brisés par agitation.

3.5.4 Aptitude du lait nature et modifié à la croissance de fragments de grain

L'objectif des essais décrits dans ce paragraphe était de vérifier l'aptitude du lait de vache, nature et modifié de façon à favoriser le développement de la matrice des grains, à la croissance de petites structures de grain.

Le lait de vache est un substrat de croissance et de propagation de grains de kéfir répandu et convenait au grain mère de kéfir KJ qui y était entretenu et s'y développait (Ninane, 2002). Certaines observations relevées lors d'essais préliminaires d'orientation laissaient penser que, nature, il ne convenait peut-être pas à la préservation et dès lors à la croissance de très petites structures de grains. Lors des tests de filtration d'extraits de grain visant à identifier la ou les techniques les plus appropriées, des fragments de grain visibles dans le lait d'extraction en grossissement de 2 X n'y étaient plus visibles après 2 jours. Parallèlement, des petites structures de grain d'environ 3 ~ 6 mm³, récupérées dans des gels

formés à partir d'extraits "tests" pour déterminer le procédé expérimental de préservation des caillés (paragraphe 3.5.2), disparaissaient parfois après leur transfert dans du lait. L'observation attentive de l'une d'elle révéla qu'au terme de 5 jours la structure avait perdu son élasticité et se dispersait dans le lait. Par ailleurs, certains éléments de la littérature laissaient penser que des conditions particulières étaient susceptibles d'interagir positivement avec le développement de la matrice des grains. Elles ont été relevées et simulées en modifiant le lait.

Les données de la littérature mettent en évidence une interaction positive des levures sur la production de kéfirane, l'exopolysaccharide constitutif de la matrice des grains, qu'elles stimulent (la Rivière, 1967 ; Schoevers & Britz, 2003 ; Cheirsilp *et al.*, 2003a et 2003b). Un accroissement de la population de levures des extraits de grain a été simulé par l'ajout d'extrait de levure au lait. Parallèlement, la croissance de la levure *Kazachstania exigua* identifiée dans le consortium a été favorisée par l'ajout de glucose au lait. *K. exigua* est une levure incapable d'utiliser le lactose comme source d'énergie et dépend à ce titre des autres micro-organismes dont elle utilise les sous-produits.

Un autre aspect relatif au kéfirane a été envisagé ; il relève des propriétés physico-chimiques de l'exopolysaccharide. Soluble dans l'eau, le kéfirane gélifie en présence d'alcool (Mukai *et al.*, 1991). La production d'alcool a été simulée par l'ajout d'alcool au lait et incitée, parallèlement, par les conditions d'atmosphère appliquées.

Beijerinck (1889²⁸) et Lacrosse (1981) notent par ailleurs la présence de caillettes de veau dans le fond des conteneurs de préparation du kéfir. Les caillettes de veau contiennent une enzyme de coagulation du lait, la chymosine, connue et utilisée en fromagerie pour cette propriété. Elles sont par ailleurs très acides (pH ~ 1) et ont pu modifier le pH du lait. Ces deux aspects de l'apport de caillettes de veau ont été simulés par l'ajout de présure au lait et, parallèlement, par l'acidification du lait à un pH de 5,5.

Les essais d'aptitude de ces différents laits à la croissance de petites structures de grain étaient envisagés sur une durée d'incubation de 2 semaines. La limitation de la durée des essais imposait la présence dans les extraits de fragments de taille particulière mais

²⁸ Beijerinck M.W., 1889. Sur le kéfir. *Arch. Néerl. Sci. Exactes Nat.* **23**, 428-444. Cité par : Pidoux, 1984.

imprécise : ils devaient être petits pour représenter des petites structures et suffisamment grands pour être décelés dans les laits fermentés au terme de l'expérimentation. Pour satisfaire ces conditions, deux extraits du grain KJ de granulométries différentes, déterminées par le procédé de préparation, ont été mis en oeuvre.

Caractérisation des extraits de grain

Pour éviter un contact avec du métal, le consortium des grains a été dispersé dans du lait par battage dans un Stomacher. Ce mode de dispersion générait un mélange de fragments de grains de dimensions variables dont les plus gros étaient écartés des extraits par filtration. Les deux extraits mis en oeuvre dans l'essai d'aptitude des laits se distinguaient par le degré de filtration appliqué : grossier au travers de couches de gaze ou plus fin au travers d'un filtre à chicorée.

La taille des fragments de grain que ces deux modes de filtration laissaient dans les extraits a été évaluée par l'examen des plus gros fragments isolés des extraits par tamisage. L'immersion des fragments ainsi isolés dans de l'eau permettait de les examiner en 3 dimensions. De formes variées, le volume des fragments a été calculé en les assimilant à des formes sphériques ou ellipsoïdales parfaites selon leur configuration. Les dimensions des formes parfaites dans lesquelles s'inscrivaient les fragments ont été mesurées au grossissement de 50 X à l'aide d'une échelle graduée en dixième de mm.

Les mesures ont été répétées 3 fois dans le temps, sur des extraits fraîchement préparés indépendants de ceux utilisés pour mettre en place l'essai d'aptitude des laits. La taille des 3 plus gros fragments présents dans chacun des extraits a, à chaque fois, été retenue pour estimer la taille maximale moyenne des fragments laissés dans les extraits par les deux modes de filtration. Les fragments de l'extrait filtré au travers de la gaze et ceux de l'extrait filtré au travers du filtre à chicorée atteignaient en moyenne $(3 \pm 1) \text{ mm}^3$ et $(0,3 \pm 0,1) \text{ mm}^3$ respectivement.

Taux d'ensemencement des laits avec les extraits

Les extraits étaient préparés en dispersant des grains dans un volume de lait équivalent à leur poids. Les fragments grossiers étaient ensuite écartés de l'extrait brut par filtration. La fraction écartée lors de la préparation des 3 extraits grossièrement filtrés représentait

(85 ± 1) % de la quantité de grains mise en oeuvre dans l'extrait brut. Calculé par différence, ~1 ml d'extrait comprenait 15 % de la masse de grain (p/v).

Les laits ont été inoculés à raison de 1 ml d'extrait pour 10 ml de lait, ce qui équivaut à un taux d'ensemencement de 1,5 % (p/v) en terme de masse de grains.

Structures apparentées à des grains récoltés dans les laits fermentés

Après 2 semaines d'incubation à 22 °C, les laits fermentés ont été tamisés au travers du filtre à chicorée. Fabriqué dans une matière synthétique souple, le filtre à chicorée permettait d'écraser son contenu (les gels) entre les doigts pour en révéler les particules solides. La consistance des particules récoltées a ensuite été évaluée par pression sur un fond dur à l'aide d'une spatule.

Quelques particules solides révélaient, lors de ce test, une consistance élastique comparable à celle des grains de kéfir. Observées au binoculaire sous un grossissement de 10 X, certaines d'entre elles présentaient une forme boursouflée (chou-fleur) typique de grains de kéfir qui permettait d'apparenter sans ambiguïté ces particules "élastiques" à des grains de kéfir.

Ces particules apparentées à de petites structures de grains de kéfir ont exclusivement été révélées dans l'essai amorcé avec l'extrait de grains plus grossièrement filtré ; aucune particule de ce type n'a été mise en évidence dans les laits fermentés de l'essai amorcé avec l'extrait de grains plus finement filtré. L'absence de particule dans les laits fermentés de l'essai amorcé avec l'extrait de grains plus finement filtré laissait empiriquement présager un défaut de croissance des fragments. Tamisés avec le filtre qui avait servi à préparer l'extrait, les laits fermentés auraient dû livrer des petites structures de grain si les fragments y avaient grossi, même faiblement. Par ailleurs, la taille des particules récoltées dans les laits fermentés de l'essai amorcé avec l'extrait de grains plus grossièrement filtré ne permettait pas de déterminer si elles émanaient d'un processus de croissance ou simplement de la préservation des fragments : les plus grosses d'entre elles avaient une taille (Tableau 3.5.1) équivalente à celle des plus gros fragments de l'extrait. Dans l'hypothèse où une croissance de ces fragments de grain a eu lieu, elle n'était pas probante.

Conditions favorables à la croissance et/ou à la préservation de petites structures de grain

Les laits fermentés de l'essai amorcé avec l'extrait plus grossièrement filtré ne livraient pas tous des particules apparentées à des structures de grain ; la plupart d'entre eux en étaient dépourvus (Tableau 3.5.1). Seuls deux laits fermentés ont livré un nombre conséquent de particules de façon répétable : les laits incubés en anaérobiose qui avaient été additionnés de glucose ou d'éthanol (Tableau 3.5.1).

Tableau 3.5.1 : Nombre et taille des structures de grain récoltées dans les laits fermentés à partir d'un extrait de grain grossièrement filtré.

| Lait | Conditions d'atmosphère | Nombre de structures de grain récoltées par répétition | | Taille des structures de grain récoltées (mm ³) |
|--------------------------|-------------------------|--|---|---|
| Lait nature | Aérobiose | 0 | 0 | - |
| | Anaérobiose | 0 | 0 | - |
| Lait _{5,5} | Aérobiose | 0 | 0 | - |
| | Anaérobiose | 0 | 0 | - |
| Lait + présure | Aérobiose | 0 | 2 | 0,2 et 0,3 |
| | Anaérobiose | 0 | 0 | - |
| Lait + extrait de levure | Aérobiose | 0 | 1 | 0,4 |
| | Anaérobiose | 0 | 0 | - |
| Lait + glucose | Aérobiose | 0 | 0 | - |
| | Anaérobiose | 5 | 6 | de 0,1 à 0,5 |
| Lait + éthanol | Aérobiose | 0 | 0 | - |
| | Anaérobiose | 4 | 4 | de 0,2 à 3,4 |

Incubés en anaérobiose, le lait additionné d'éthanol et le lait additionné de glucose sont théoriquement des conditions qui stimulent la croissance des lactobacilles, parmi lesquels figurent les micro-organismes producteurs de l'exopolysaccharide constitutif des grains, et qui renforcent, directement ou indirectement, la présence d'alcool dans le milieu.

En milieu de synthèse, les conditions d'anaérobiose sont en général plus favorables à la croissance des lactobacilles que les conditions d'aérobiose (Kandler & Weiss, 1984). Une stimulation de la croissance bactérienne ne conduit pas nécessairement à une augmentation de la production d'exopolysaccharide : c'est généralement dans des conditions sub-létales que les bactéries lactiques mésophiles produisent un maximum d'exopolysaccharides (De Vuyst *et al.*, 2001). Dans le cas des lactobacilles impliqués dans la production de kéfirane, l'exopolysaccharide constitutif de la matrice des grains, le taux de production semble toutefois liée à leur croissance : en milieu de synthèse, la production de kéfirane est corrélée à la croissance de la souche de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* étudiée par Cheirsilp *et al.* (2001a).

Des conditions d'anaérobiose déterminent par ailleurs la production d'éthanol par les levures. En présence d'une levure incapable de fermenter le lactose, comme c'est le cas de *Kazachstania exigua*, la levure du grain KJ, l'ajout de glucose au lait stimule en principe la croissance du micro-organisme et, dans des conditions d'anaérobiose, la production d'alcool.

Dans l'hypothèse où ces conditions particulières stimulent la production de kéfirane, l'exopolysaccharide constitutif de la matrice du grain de kéfir produit par des lactobacilles, et augmentent simultanément le taux d'alcool, la répartition des grains récupérés au travers de cet essai pourrait résulter de l'expression d'une propriété physique du kéfirane. Le kéfirane est en effet un exopolysaccharide soluble dans l'eau qui gélifie en présence d'alcool (Mukai *et al.*, 2001).

3.5.5 Activités de biosynthèse du consortium microbien extrait du grain

Expression des activités de biosynthèse

L'aspect des gels formés à partir de ces deux extraits de grains, préparés indépendamment, c'est-à-dire à des moments différents (Essai 1 et Essai 2, Tableau 3.5.2), variait selon le type de lait et les conditions d'atmosphère appliquées. Les gels des laits acidifiés à un pH de 5,5 et des laits additionnés de présure n'ont pas été pris en compte en raison d'une contamination de ces laits dans le second essai.

Tableau 3.5.2 : Aspect des laitsensemencés avec des extraits du grain KJ, après 2 semaines d'incubation à 22 °C. Les données concernent la structure (Structure) ainsi que la texture et le pH des gels après homogénéisation (Texture/pH) ou le pH des liquides (pH_{liquide}).

| Objet _(n) | Essai 1 | | Essai 2 | |
|---|--|-------------------------------------|---|--------------------------------------|
| | Structure | Texture/pH ou pH _{liquide} | Structure | Texture/pH ou pH _{liquide} |
| <u>Lait nature - aérobiose</u> | | | | |
| T ₍₁₎ | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : ND | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : 6,5 |
| E ₍₂₎ | Gel homogène de couleur crème, exsudat jaune gluant | Fine, visqueuse / pH : ND | Gel homogène de couleur crème | Fine, visqueuse / pH : 4,5 - 4,5 |
| <u>Lait nature - anaérobiose</u> | | | | |
| T ₍₁₎ | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : ND | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : 6,7 |
| E ₍₂₎ | Gel blanc homogène | Fine, visqueuse / pH : ND | Gel blanc homogène | Fine, visqueuse / pH : 3,5 - 3,5 |
| <u>Lait + extrait de levure - aérobiose</u> | | | | |
| T ₍₁₎ | Liquide non gluant de couleur crème | pH _{liquide} : ND | Liquide non gluant de couleur crème | pH _{liquide} : 6,4 |
| E ₍₂₎ | Gel craquelé de couleur crème foncé, exsudat jaune très gluant | Floconneuse, visqueuse / pH : ND | Liquide non gluant de couleur crème dans lequel flottent des peaux de couleur crème | pH _{liquide} : 8,2 - 8,3 |
| <u>Lait + extrait de levure - anaérobiose</u> | | | | |
| T ₍₁₎ | Liquide non gluant de couleur crème | pH _{liquide} : ND | Liquide non gluant de couleur crème | pH _{liquide} : 6,4 |
| E ₍₂₎ | Gel homogène de couleur crème | Fine, visqueuse / pH : ND | Gel homogène de couleur crème | Fine, visqueuse / pH : 3,4 - 3,4 |
| <u>Lait + glucose - aérobiose</u> | | | | |
| T ₍₁₎ | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : ND | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : 6,4 |
| E ₍₂₎ | Gel homogène de couleur crème, exsudat jaune gluant | Fine, visqueuse / pH : ND | Gel homogène de couleur crème | Fine, visqueuse / pH : 4,4 - 4,5 |
| <u>Lait + glucose - anaérobiose</u> | | | | |
| T ₍₁₎ | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : ND | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : 6,8 |
| E ₍₂₎ | Gel blanc homogène | Fine, visqueuse / pH : ND | Gel blanc homogène | Fine, visqueuse / pH : 3,6 - 3,6 |
| <u>Lait + éthanol - aérobiose</u> | | | | |
| T ₍₁₎ | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : ND | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : 6,3 |
| E ₍₂₎ | Gel homogène de couleur crème clair | Fine, visqueuse / pH : ND | Gel homogène de couleur crème clair | Fine, non visqueuse / pH : 4,2 - 4,1 |
| <u>Lait + éthanol - anaérobiose</u> | | | | |
| T ₍₁₎ | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : ND | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : 6,6 |
| E ₍₂₎ | Gel blanc homogène | Fine, visqueuse / pH : ND | Gel blanc homogène | Fine, visqueuse / pH : 3,6 - 3,6 |

E : laitensemencé ; T : lait nonensemencé ; n : nombre d'échantillons ; ND : non déterminé

L'aspect des gels obtenus en condition d'anaérobiose était reproductible, c'est-à-dire identique entre les deux essais répétés dans le temps (Essai 1 et Essai 2, Tableau 3.5.2). En condition d'aérobiose par contre, l'aspect des gels ou des laits fermentés différait entre les deux essais répétés dans le temps par les caractéristiques suivantes :

- la présence dans le premier essai (Essai 1, Structure, Tableau 3.5.2) de zones d'exsudat jaune gluant sur les gels obtenus à partir de lait nature, de lait additionné d'extrait de levure et de lait additionné de glucose. Ces zones d'exsudat jaune gluant à la surface des gels faisaient défaut dans le second essai (Essai 2, Structure, Tableau 3.5.2) mais les mouvements circulaires exécutés à l'aide d'une spatule pour homogénéiser les gels faisaient apparaître, lors des premiers mouvements, des filaments d'exsudat jaune.
- L'absence de formation de gel et de production de substance gluante ainsi que la présence de peaux dans le lait additionné d'extrait de levure du second essai (Essai 2, Structure, Tableau 3.5.2).
- L'absence de viscosité dans le gel formé à partir de lait additionné d'éthanol du second essai (Essai 2, Texture/pH, Tableau 3.5.2).

Identification des activités de biosynthèse variables et de leurs acteurs

L'exsudat jaune gluant et la viscosité des gels témoignaient d'une activité liée à la production d'exopolysaccharides. La variabilité de cette activité était conditionnée par les conditions d'atmosphère : elle était observée en conditions d'aérobiose mais pas en conditions d'anaérobiose.

Le consortium identifié dans le grain de kéfir KJ comprend deux taxons susceptibles de produire significativement des exopolysaccharides en aérobiose : *Acetobacter* sp. et *Leuconostoc mesenteroides*.

Les *Acetobacter* sp. sont décrits comme des producteurs d'exopolysaccharide aérobies strictes (De Ley *et al.*, 1984). La souche isolée du grain KJ produisait apparemment de l'exopolysaccharide en bouillon de synthèse : une substance dense surmontant le culot cellulaire y était visible par la turbidité qu'elle provoquait dans le bouillon. Il est probable qu'elle ait contribué à la variabilité de la production d'exopolysaccharide observée entre les deux essais.

Leuconostoc mesenteroides comprend des souches laitières productrices d'exopolysaccharide et produit un maximum d'exopolysaccharide en aérobiose (Cerning, 1990). Celles du kéfir KJ ne semblaient pas produire d'exopolysaccharide : les colonies développées sur le milieu de Mayeux à l'occasion de leur isolement du grain ne paraissaient pas luisantes. Toutefois, la capacité des *Ln. mesenteroides* du grain à produire de l'exopolysaccharide n'a pas fait l'objet d'une recherche particulière et on ne peut formellement exclure cette éventualité.

Les peaux formées dans le second essai semblaient provenir d'une activité microbienne et non d'une modification physique du substrat (séchage du lait en surface par exemple) : elles étaient absentes dans le lait stérile incubé en parallèle. Par ailleurs, le pH du lait inoculé était modifié par rapport à celui du témoin stérile et témoignait, lui aussi, d'une activité microbienne.

La formation de peaux était liée à une augmentation du pH du lait. Dans le domaine laitier, une élévation du pH est une modification qui intervient dans la maturation des fromages. Deux mécanismes microbiens peuvent en être à l'origine : la consommation de l'acide lactique produit dans le caillé et la protéolyse des caséines. Les micro-organismes protéolytiques impliqués dans la maturation des fromages comprennent, notamment, des levures (Alais, 1974 ; Anonyme INRA, 2008). Les bactéries lactiques ont également une activité protéolytique à l'encontre de la caséine et semblent contribuer à la maturation de certains fromages, de type Emmental (Gagnaire *et al.*, 2001), mais elles sont peu protéolytiques comparativement aux levures (Monnet & Gripon, 1994). Par ailleurs, tandis que les bactéries lactiques produisent de l'acide lactique, certaines levures d'affinage en consomment. La levure du consortium du grain de kéfir KJ, *Kazachstania exigua*, comprend des souches capables d'assimiler de l'acide lactique (Barnett *et al.*, 2000). La capacité de la souche de *K. exigua* du grain KJ à consommer de l'acide lactique n'a pas été vérifiée mais cela n'hypothèque pas sa contribution probable à la protéolyse de la caséine du lait et à l'augmentation de pH observée dans le second essai.

Origine de la variabilité des activités de biosynthèse

L'activité microbienne du consortium extrait du grain de kéfir KJ a varié d'un essai à l'autre notamment au niveau de la production d'exopolysaccharides, exprimée directement par la présence d'exsudat gluant ou indirectement au travers de la viscosité des gels.

Le lait utilisé était d'origine différente et a pu, par la constance incertaine de sa qualité, avoir un effet sur l'activité microbienne du consortium. L'activité des ferments lactiques est en effet connue pour varier en fonction de variations, notamment saisonnières, de la composition du lait (Desmazeaud, 1994).

L'inconstance de la composition microbienne quantitative du grain de kéfir KJ constituait également une source potentielle de variabilité. Elle pouvait générer, malgré l'application de procédures identiques d'extraction du consortium et d'ensemencement du lait par l'extrait, une variabilité des taux réels d'ensemencement des micro-organismes individuels. L'influence du taux d'ensemencement sur la teneur en certains exopolysaccharides et sur la viscosité de kéfirs préparés à partir de grains a été étudiée par Garrote *et al.* (1998) et par Rimada & Abraham (2001). Dans ces expérimentations, une différence d'ensemencement d'un facteur 10 conduit à une modification des paramètres examinés. La variabilité de l'abondance dans le grain KJ de tous les groupes microbiens pour lesquels elle a été estimée (paragraphe 3.2.2) pouvait conduire à une différence d'ensemencement d'un facteur 10.

3.5.6 *Activités de biosynthèse du consortium reconstitué à partir des souches individuelles*

Dans le but de confirmer l'activité microbienne de formation de peaux avec un consortium plus facilement maîtrisable, deux essais ont été mis en place à partir des souches individuelles isolées du grain de kéfir KJ. Le consortium reconstitué utilisé dans chacun des deux essais a été standardisé par la mise en oeuvre de quantités identiques de précultures standardisées des souches (Tableau 2.6.1).

Conception des essais

Dans ces essais, la production de kéfirane a été stimulée par le conditionnement des souches qui en étaient potentiellement productrices. Deux lactobacilles isolés du grain de kéfir KJ produisaient, sur un milieu KPL, de l'exopolysaccharide susceptible d'être du kéfirane : *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* et *Lb. kefiri* (paragraphe 3.4.1). Les souches de *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* et *Lb. kefiri* utilisées dans les essais avaient été isolées sur ce milieu KPL et ont été cultivées, avant la mise en place des essais, dans ce substrat (non gélosé) qui induisait chez elles la production d'exopolysaccharide.

Le consortium reconstitué à partir des souches ainsi conditionnées a été incubé dans du lait nature et non dans du lait additionné d'extrait de levure. Partant de l'hypothèse que la

production de kéfirane par les souches conditionnées était accrue par rapport à celle du consortium extrait du grain, il ne semblait pas nécessaire de la stimuler davantage en ajoutant de l'extrait de levure.

Parallèlement, le consortium reconstitué et conditionné a été incubé dans les conditions favorisant théoriquement la gélification du kéfirane : en anaérobiose dans du lait additionné de glucose ou d'éthanol.

Aspect des gels

L'incubation des laits inoculés à 22 °C pendant 2 semaines donnait lieu à des modifications variables du substrat selon les conditions de culture appliquées (Tableau 3.5.3).

Les modifications observées étaient reproductibles, c'est-à-dire similaires entre les deux essais répétés dans le temps (Essai 1 et Essai 2, Tableau 3.5.3).

Le lait utilisé dans ces deux essais était, comme précédemment, d'origines différentes. Cette différence d'origine constituait une source potentielle de la variabilité observée dans l'expression des activités microbiennes des consortiums extraits du grain (paraphe 3.5.3). La reproductibilité observée ici écartait cette éventualité vis-à-vis des activités microbiennes exprimées par les consortiums reconstitués.

L'expression de ces activités microbiennes différait de celle obtenue avec les consortiums extraits du grain, par l'absence de viscosité dans les gels formés en anaérobiose.

Structures microbiennes

Sans surprise, au vu des résultats antérieurs (paragraphe 3.5.3), aucune structure apparentée à des grains de kéfir n'a été détectée dans les laits fermentés.

Les deux consortiums reconstitués formaient par contre des peaux comparables à celles observées dans le lait additionné d'extrait de levure fermenté en aérobiose par un des consortiums extraits du grain KJ (Essai 2, Tableau 3.5.1). Ces peaux se formaient dans le lait fermenté en aérobiose (Essai 1 et Essai 2, Tableau 3.5.2). Formées exclusivement en présence d'un consortium microbien, elles ont été assimilées à des biofilms.

Tableau 3.5.3 : Aspect des laitsensemencés avec le consortium reconstitué à partir des micro-organismes isolés du grain KJ, après 2 semaines d'incubation à 22 °C. Les données concernent la structure (Structure) ainsi que la texture et le pH des gels après homogénéisation (Texture/pH) ou le pH des liquides (pH_{liquide}).

| Objet _(n) | Essai 1 | | Essai 2 | |
|-------------------------------------|--|---|--|---|
| | Structure | Texture/pH ou pH _{liquide} | Structure | Texture/pH ou pH _{liquide} |
| <u>Lait nature - aérobiose</u> | | | | |
| T ₍₁₎ | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : 6,6 | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : 6,6 |
| E ₍₂₎ | Liquide blanc non gluant sur lequel flotte une peau de couleur crème | pH _{liquide} : 6,4 - ND | Liquide blanc non gluant dans lequel flottent des peaux de couleur crème | pH _{liquide} : 6,5 - ND |
| <u>Lait nature - anaérobiose</u> | | | | |
| T ₍₁₎ | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : 6,4 | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : 6,4 |
| E ₍₂₎ | Gel blanc homogène, surnageant liquide translucide non gluant | Floconneuse à pelliculaire, non visqueuse / pH : 4,0 - ND | Gel blanc homogène, surnageant liquide translucide non gluant | Floconneuse à pelliculaire, non visqueuse / pH : 4,8 - ND |
| <u>Lait + glucose - anaérobiose</u> | | | | |
| T ₍₁₎ | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : 6,4 | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : 6,3 |
| E ₍₂₎ | Gel blanc homogène, surnageant liquide translucide non gluant | Floconneuse à pelliculaire, non visqueuse ; pH : 4,0 - ND | Gel blanc homogène, surnageant liquide translucide non gluant | Floconneuse à pelliculaire, non visqueuse ; pH : 4,9 - ND |
| <u>Lait + éthanol - anaérobiose</u> | | | | |
| T ₍₁₎ | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : 6,4 | Liquide blanc non gluant | pH _{liquide} : 6,3 |
| E ₍₂₎ | Gel blanc homogène, surnageant liquide translucide non gluant | Floconneuse à pelliculaire, non visqueuse ; pH : 4,2 - ND | Gel blanc homogène, surnageant liquide translucide non gluant | Floconneuse à pelliculaire, non visqueuse ; pH : 4,9 - ND |

E : laitensemencé ; T : lait nonensemencé ; n : nombre d'échantillons ; ND : non déterminé

3.5.7 Comportement des souches individuelles

Croissance des souches individuelles

Dans chacun des essais, les témoins de croissance des souches individuelles attestent d'un développement de tous les micro-organismes mis en présence à l'exception de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*. La souche de *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* ne produisait pas de trouble dans les bouillons MRS_{5,4} incubés en parallèle des essais.

L'absence de croissance de *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* dans le bouillon MRS_{5,4} ne signifie pas nécessairement que la souche ne s'était pas développée dans le lait en présence du consortium microbien ; de nombreux micro-organismes croissent difficilement hors de leur environnement (Verstraete, 2008). Le cas est explicitement exprimé par Witthuhn *et al.* (2004) pour les bactéries du kéfir. Cependant, cette souche de *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* était initialement capable de croître dans le bouillon MRS_{5,4} : elle avait été cultivée dans ce bouillon à l'occasion de son identification phénotypique. L'absence de croissance dans le bouillon MRS_{5,4} incubé en parallèle des essais témoignait dès lors d'une modification de la capacité de croissance de la souche, probablement due aux repiquages successifs en bouillon KPL.

Le défaut de viscosité dans les gels formés en anaérobiose appuyait l'éventualité d'une absence de croissance de cette souche dans le lait. La souche *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* était un producteur d'exopolysaccharide anaérobie susceptible dès lors de participer à la viscosité des gels formés en anaérobiose. De surcroît, la souche utilisée dans ces essais produisait sur le milieu KPL gélosé une colonie luisante dont la forme bombée suggérait qu'elle soit visqueuse.

Parallèlement, l'absence de viscosité dans les gels témoignait d'une absence de participation de l'autre producteur anaérobie avéré d'exopolysaccharide : *Lb. kefiri*. La souche de *Lb. kefiri* utilisée dans ces essais provenait d'une colonie luisante qui, par son manque de tenue, s'étalait sur le milieu gélosé et était apparemment peu visqueuse. Il est probable que cet exopolysaccharide contribue peu à la viscosité des gels.

Agglutination des souches individuelles

Les souches de *Acetobacter* sp. et de *Lb. kefiri* formaient des agglomérats ressemblant à des peaux, lisses et boursouflées respectivement, dans les bouillons de synthèse incubés en parallèle des essais comme témoin de croissance.

Les souches de *Leuconostoc mesenteroides* et de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* formaient par contre, dans les témoins de croissance, des dépôts poudreux et semblaient dépourvues de propriétés d'agglutination.

Contre toute attente, *Lb. parakefiri* et *Kazachstania exigua* ne se développaient pas, dans leurs bouillons de synthèse respectifs, en un dépôt poudreux mais formaient des petits granules sphériques.

3.5.8 Aspect des biofilms

Les biofilms (Figure 3.5.2) s'assemblaient, lors du tamisage des laits, en un amas plastique. L'amas était relativement résistant à l'écrasement, c'est-à-dire qu'il était difficile à disperser en particules suffisamment petites pour passer au travers des mailles du filtre à chicorée. La cohésion de l'amas ne s'apparentait toutefois pas à celle des grains.



Figure 3.5.2 : Biofilm formé à la surface du lait ensemencé par le consortium reconstitué à partir des micro-organismes individuels isolés du grain KJ. Le biofilm est présenté dans de l'eau et a été froissé à l'occasion de la manipulation. Constitué de matière collante, il n'a pas été possible de le redéployer.

4 DISCUSSION

4.1 Qualité hygiénique du grain de kéfir KJ

Le grain de kéfir KJ était d'origine domestique, ce qui implique qu'avant son acquisition par le CRA-W, il était cultivé dans des conditions d'hygiène incertaines. Devant l'incertitude quant à sa qualité hygiénique, la condition préalable à sa distribution publique était de vérifier son innocuité.

4.1.1 Sensibilité du grain à des germes contaminants

La sensibilité du grain de kéfir KJ à une colonisation par des germes pathogènes a été évaluée au travers de l'évolution de son acidité au cours des cycles hebdomadaires de culture. L'acidité du milieu est en effet un facteur limitant pour la croissance de la plupart des pathogènes.

Le seuil de pH en dessous duquel les germes pathogènes ne se développent pas varie selon la souche mais aussi en fonction de l'environnement. Pour *Listeria monocytogenes*, par exemple, le pH minimal pour croître varie selon la souche examinée de 5,0 à 5,7 à 4 °C et de 4,3 à 5,2 à 30 °C (Farber *et al.*, 1989). Le comportement des micro-organismes dépend en outre de la matrice alimentaire considérée : regardant un composant unique, l'acide utilisé pour abaisser le pH du milieu de culture, Farber *et al.* (1989) rapportent que les acides acétique, lactique, citrique et hydrochlorique n'ont pas le même pouvoir inhibiteur sur la croissance des souches de *Listeria monocytogenes* étudiées. A pH égal, la composition en acides organiques du kéfir a un pouvoir inhibiteur supérieur à celle du yaourt à l'encontre d'une souche pathogène de *Escherichia coli* (Garrote *et al.*, 2000). Toutefois, à défaut de données établies dans les conditions particulières au grain de kéfir, les valeurs seuil de pH diffusées par la Food and drug administration des USA (Anonyme FDA, 1999), qui revêtent un caractère général, ont été utilisées comme base de discussion pour l'évaluation globale de la sensibilité du grain KJ.

Parmi les germes pathogènes prévalant dans nos régions (Imberechts *et al.*, 2004 ; Anonyme European Food Safety Authority, 2005 ; Vaillant *et al.*, 2005), les plus tolérants à l'acidité - *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* et *Bacillus cereus* - ne se développent généralement pas à des pH inférieurs à 4,2 ; 4,4 ; 4,5 ; 4,6

et 4,9 respectivement. *Campylobacter jejuni* qui est, après *Salmonella* sp., responsable du plus grand nombre de cas déclarés de maladie infectieuse d'origine alimentaire ne croît normalement pas à un pH inférieur à 5,5 (Anonyme FDA, 1999).

En dessous de ces valeurs limites de pH, le milieu devient létal pour ces germes et leurs populations décroissent au cours du temps. Dans un kéfir dont l'acidité est de pH 4,0, des populations de $8 \cdot 10^4$ et $6 \cdot 10^4$ ufc.ml⁻¹, de *Listeria monocytogenes* et de *Escherichia coli* O157:H7 respectivement, ne sont plus détectées au terme de 10 jours de conservation à 4 °C (Gulmez & Guven, 2003). Dans les mêmes conditions, une autre souche de *E. coli* O157:H7, la souche "932", inoculée dans le kéfir à raison de 10^7 ufc.ml⁻¹, n'est plus détectée après 8 jours de conservation (Tosun *et al.*, 2007). Une plus grande tolérance à l'acidité peut toutefois être induite par adaptation des germes dans des conditions de pH sub-létales : le cas est notamment décrit pour des souches de *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *E. coli* et *Bacillus cereus* (Lee *et al.*, 1994 ; Gahan *et al.*, 1996 ; O'Driscoll *et al.*, 1996 ; Wilmes-Riesenberg *et al.*, 1996 ; Browne & Dowds, 2002 ; Tosun *et al.*, 2007). Dans le kéfir, la survie de la souche "932" de *E. coli* O157:H7 est alors prolongée de 4 jours (Tosun *et al.*, 2007).

Par rapport aux valeurs indicatrices de pH seuil, l'acidité du grain de kéfir KJ atteignait, le plus souvent, des valeurs de pH létales pour les bactéries pathogènes préoccupantes dans nos régions. Les valeurs de pH du grain étaient néanmoins parfois supérieures au pH minimal compatible avec un développement de *Staphylococcus aureus* en début de cycle de fermentation. De plus, pendant les 2 à 3 premières heures du cycle quotidien de fermentation, l'acidité du grain s'inscrivait dans des valeurs de pH proches de celle permettant d'induire, par adaptation, une plus grande résistance à l'acidité chez une souche de *Salmonella typhimurium*. Un séjour de 2 heures dans un milieu de pH 4,3 conduit à ce type de résistance chez cette souche lorsqu'elle est en phase de croissance stationnaire (Lee *et al.*, 1994). Dans les autres cas de résistance induite, les pH d'adaptation appliqués sont nettement supérieurs aux pH mesurés dans le grain de kéfir KJ à tous les stades du cycle de culture (Gahan *et al.*, 1996 ; O'Driscoll *et al.*, 1996 ; Wilmes-Riesenberg *et al.*, 1996 ; Browne & Dowds, 2002 ; Tosun *et al.*, 2007). Cependant, un séjour prolongé dans un milieu très acide tel que celui mesuré dans le grain KJ en fin de cycle de fermentation peut conduire à la sélection de mutants plus résistants à ce facteur de stress ; le cas est rapporté pour *Listeria monocytogenes* après une exposition de 18 heures à un pH de 3,5 (O'Driscoll *et al.*, 1996).

4.1.2 *Germes pathogènes et indicateurs de défauts d'hygiène*

Tenant compte de la sensibilité du grain de kéfir KJ, son innocuité a été vérifiée par la recherche de germes pathogènes ou indicateurs d'un défaut d'hygiène. Les critères microbiologiques examinés dans ce but ont été sélectionnés sur base des textes législatifs en vigueur et sur base des recommandations de la Fédération internationale de laiterie (FIL, Bruxelles).

Les levains ne font pas, à ma connaissance, l'objet de textes de loi spécifiques relatifs à leur qualité hygiénique. Par contre, pour être commercialisés, les laits fermentés qui en sont issus doivent répondre aux exigences microbiologiques fixées par le règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires et par l'arrêté royal du 18 mars 1980 relatif au yaourt et autres laits fermentés. Ces exigences portent sur des critères de sécurité des denrées alimentaires, c'est-à-dire sur les germes pathogènes et leurs toxines, sur des germes indicateurs de défaut d'hygiène dans le procédé de fabrication ainsi que sur l'efficacité de la pasteurisation du lait. Les exigences liées à l'innocuité de l'inoculation ont été appliquées au produit de fermentation obtenu à partir du grain de kéfir KJ.

Parmi les critères de sécurité des denrées alimentaires fixés par le règlement européen (CE), *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* sp. concernent respectivement toutes les denrées alimentaires prêtes à être consommées et des produits laitiers fabriqués à partir de lait cru. Dans l'approche sécuritaire développée ici, on a considéré que le lait utilisé antérieurement à l'acquisition du grain par le CRA-W aurait pu ne pas être traité thermiquement et l'absence de contamination par *Salmonella* sp. a été vérifiée. Parmi les catégories de denrées alimentaires inventoriées pour fixer les critères liés à l'hygiène de leur procédé de fabrication, celles comprenant les fromages étaient les plus proches du kéfir. Les germes indicateurs sont dans ces cas les staphylocoques à coagulase positive. Comprenant *Staphylococcus aureus*, un germe notamment présent dans les blessures infectées, ce critère semblait particulièrement adapté à une fabrication domestique généralement effectuée à "mains nues". La législation belge prévoit, en outre, des limites d'acceptabilité de contamination des produits par des coliformes et par des moisissures dont il a été tenu compte.

La FIL (1997) préconise, pour l'évaluation de la qualité hygiénique des levains lactiques, deux critères supplémentaires : les micro-organismes contaminants et les

entérocoques. L'énumération des entérocoques est recommandée pour évaluer le niveau d'hygiène qui a présidé lors de la fabrication des laits fermentés (Vanos, 1991 ; Jouve, 1996). Selon Vanos (1991), les entérocoques constituent dans ce cas un indicateur plus approprié que les coliformes parce qu'ils sont plus tolérants à l'acidité que certains membres de ces derniers : ils peuvent normalement se développer jusqu'à des pH de 4,9-4,5 tandis que certaines souches de *Escherichia coli* ne se développent pas en dessous d'un pH de 5,0. Cependant, en regard de l'acidité du grain de kéfir, la tolérance des entérocoques était insuffisante pour fournir un indicateur fiable. Ce critère additionnel n'apportait en conséquence pas d'information complémentaire à celle fournie par les coliformes dont l'examen est imposé par la loi belge.

Les publications relatives à la composition microbienne des grains de kéfir révèlent une présence répétée, au sein du consortium microbien, de bactéries potentiellement pathogènes par voie alimentaire : *Escherichia coli* et des bactéries appartenant au genre *Bacillus* (Ottogali *et al.*, 1973 ; Angulo *et al.*, 1993 ; Chen *et al.*, 2008). L'acidité du grain de kéfir KJ était toutefois incompatible avec un développement de *E. coli* et de *B. cereus*, le *Bacillus* sp. pathogène par voie alimentaire qui prévaut dans nos régions (Imberechts *et al.*, 2004 ; Vaillant *et al.*, 2005).

Elles révèlent par ailleurs, une contamination isolée des grains de kéfir par des bactéries appartenant aux genres *Sphingobacterium*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* et *Pseudomonas* (Wang *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2008). Ce sont des bacilles Gram négatifs répandus dans la nature, non fermentaires et comptabilisés avec les bactéries qualifiées de contaminants par la FIL pour *Sphingobacterium*, *Acinetobacter* et *Pseudomonas* (Yabuuchi *et al.*, 1983 ; Elliot, 1984 ; Anonyme Centre for Infections, 2007) ou, fermentaires et comptabilisés avec les coliformes pour *Enterobacter* (Richard, 1984). Parmi ces derniers figure *E. sakazakii*, un germe pathogène à l'origine d'infections dont la relation avec une consommation d'aliments pour nourrissons a été établie (Anonyme AFSCA, 2004) et qui doit à ce titre être contrôlé dans les lait pour nourrissons de moins de 6 mois (Règlement CE n° 2073/2005). Le kéfir n'est cependant pas un aliment pour nourrissons de moins de 6 mois.

4.2 Identification et quantification des groupes microbiens du grain de kéfir KJ

4.2.1 Identification des groupes microbiens

Les données bibliographiques relatives à la composition microbienne de grains de kéfir, présentées au Tableau 1.1.1, montrent qu'ils comprennent une microflore banale diversifiée, composée de bactéries lactiques et de levures, parfois associées à des bactéries acétiques et/ou à des microcoques (Ottogalli *et al.*, 1973 ; Angulo *et al.*, 1993 ; Pintado *et al.*, 1996 ; Takizawa *et al.*, 1998 ; Lin *et al.*, 1999a ; Garrote *et al.*, 2001 ; Simova *et al.*, 2002 ; Witthuhn *et al.*, 2004 ; Mainville *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2008). Les bactéries lactiques incluent des lactobacilles, des pédiocoques, des coques lactiques, des leuconostocs et *Weissella viridescens*. Parmi les groupes microbiens recensés, ceux participant au consortium du grain de kéfir KJ ont été identifiés sur base de leur isolement par croissance sur des milieux de culture sélectifs.

Le choix des milieux de culture a été orienté par l'expérience de la Fédération internationale de laiterie (FIL, Bruxelles) en matière de dénombrement sélectif de groupes microbiens dans les produits laitiers et en particulier dans les levains lactiques composés de plusieurs espèces de bactéries lactiques. Les milieux proposés par la FIL et appliqués au kéfir KJ ciblent les coques lactiques, les leuconostocs, les levures et conjointement les lactobacilles et les pédiocoques (norme 94B:1991 et annexe de la norme 149A:1997).

La croissance exclusive des pédiocoques a été ciblée par l'ajout d'hydrochlorure de cystéine, de novobiocine et de vancomycine au milieu proposé par la FIL. Ainsi supplémenté, le milieu MRS, conduit au recouvrement de diverses souches de *Pediococcus acidilactici* et *P. pentosaceus*, les espèces de pédiocoques associées à des produits laitiers (Garvie, 1986), tout en inhibant la croissance de nombreux lactobacilles et coques lactiques (Simpson *et al.*, 2006).

Weissella viridescens, une bactérie lactique autrefois classée parmi les lactobacilles (Collins *et al.*, 1993), n'est pas mentionnée dans la norme de composition des laits fermentés de la FIL (149A:1997). La liste des bactéries citées n'est ni exhaustive ni exclusive mais il est peu probable que *W. viridescens* ait été intégrée dans le domaine d'application des méthodes de dénombrements spécifiques proposées en annexe de la norme sus-mentionnée car il s'agit d'une bactérie peu courante dans le domaine laitier. Elle n'est pas utilisée en industrie laitière

et est rarement signalée dans des laits fermentés traditionnels ; hormis dans le kéfir, sa présence a été rapportée dans du zabady, un lait fermenté égyptien (Loones, 1994) et dans du maziwa lala, un lait fermenté kenyan (Miyamoto *et al.*, 2005). *Weissella viridescens* est néanmoins décrite comme se développant volontiers sur le milieu MRS proposé par la FIL pour le dénombrement conjoint des lactobacilles et des pédiocoques (Euzéby, 2004).

La croissance sélective de *Weissella viridescens* a été éprouvée en parallèle par l'ajout de chlorure de sodium au milieu APT proposé par Evans & Niven (1951) pour l'isolement des *Weissella* sp. D'après les auteurs à l'origine de la description de l'espèce, *W. viridescens* supporte en effet jusqu'à 6,5 % de NaCl dans ce milieu de culture (Niven & Evans, 1957). La description de l'espèce repose cependant sur des souches d'origine carnée, isolées de préparations salées (saucisses) et l'halotolérance de souches d'origine laitière provenant de substrats non salés, comme c'est le cas du kéfir, n'est pas documentée. L'halotolérance d'une souche laitière provenant de lait pasteurisé a toutefois été confirmée dans le cadre de cette étude.

L'absence de développement microbien, à partir du kéfir KJ, sur les milieux MRS et APT supplémentés pour les sélections exclusives de pédiocoques et de *Weissella viridescens* permettait d'exclure une croissance de ces bactéries sur le milieu MRS. Ainsi, dans le contexte du kéfir KJ, le milieu MRS ciblait la croissance sélective des seuls lactobacilles.

Les microcoques sont des bactéries apparentées aux fromages dont ils contribuent à la maturation (Bhowmik & Marth, 1990). Ils partagent avec *Weissella viridescens* la propriété d'halotolérance mais s'en distinguent par une moindre exigence en éléments nutritifs et par le besoin en oxygène (Kocur, 1986). Ces caractéristiques ont été mises à profit pour les sélectionner dans le contexte du kéfir. Dans leur introduction, Denis *et al.* (2001) recensent divers milieux de culture utilisés pour isoler les microcoques à partir de matrices alimentaires. Le choix a été dicté par l'application laitière du milieu de base, le PCA au lait écrémé, et par le succès des isollements de microcoques à partir de fromages effectués par Mounier *et al.* (2005) sur ce milieu additionné de NaCl.

La sélectivité du milieu utilisé pour mettre en évidence les bactéries acétiques reposait sur leur capacité à utiliser de l'alcool comme source de carbone (De Ley *et al.*, 1984).

Appliqués au kéfir KJ les différents milieux ont conduit à l'isolement de lactobacilles, de coques lactiques, de leuconostocs, de bactéries acétiques et de levures. Aucun développement de pédiocoques, de *Weissella viridescens* ou de microcoques n'a par contre été observé. Les lactobacilles, les coques lactiques et les levures sont des micro-organismes ordinaires de grains de kéfir ; ils figurent parmi le consortium de tous les grains dont la caractérisation microbienne est étendue (Ottogalli *et al.*, 1973 ; Angulo *et al.*, 1993 ; Garrote *et al.*, 2001 ; Simova *et al.*, 2002). Les leuconostocs et les bactéries acétiques n'y sont pas toujours représentés mais ont été isolés de grains de kéfir par quelques auteurs (Ottogalli *et al.*, 1973 ; Angulo *et al.*, 1993 ; Garrote *et al.*, 2001). Les pédiocoques, *W. viridescens* et les microcoques ont par contre, à ma connaissance, exclusivement été isolés de grains de kéfir par Angulo *et al.* (1993). L'identification de pédiocoques, de *W. viridescens* et de microcoques dans des grains de kéfir n'émane, dans ce cas, pas d'une recherche orientée vers leur mise en évidence spécifique. Autrement dit, d'autres auteurs auraient dû les détecter s'ils avaient été des constituants habituels de grains de kéfir.

4.2.2 Quantification des groupes microbiens

L'abondance dans le grain de kéfir KJ des cinq groupes microbiens identifiés - les lactobacilles, les coques lactiques, les leuconostocs, les bactéries acétiques et les levures - a été déterminée en terme d'unités viables (ufc.g⁻¹).

L'abondance moyenne des différents groupes microbiens du grain KJ était inégale. Le grain KJ se caractérisait, à l'instar d'autres grains (Vayssier, 1978 ; Molska *et al.*, 1980 ; Angulo *et al.*, 1993 ; Pintado *et al.*, 1996, Garrote *et al.*, 2001 ; Witthuhn *et al.*, 2004 ; Guzel-Seydim *et al.*, 2005), par une dominance de la population de lactobacilles. La proportion de lactobacilles y était du même ordre de grandeur que dans les grains étudiés par Simova *et al.* (2002) qui la chiffrent entre 83 % et 90 % de la flore totale. Le grain de kéfir KJ était par ailleurs similaire au grain cultivé par Pintado *et al.* (1996) du point de vue de son abondance moyenne en lactobacilles, en coques lactiques et en levures. Estimées à partir du graphique fourni par ces auteurs, les abondances en lactobacilles en coques lactiques et en levures de ce grain sont en effet d'environ 10⁸ cfu.g⁻¹, 10⁴ cfu.g⁻¹ et 10⁷ cfu.g⁻¹ respectivement. Le grain de kéfir KJ s'en écartait par contre par la présence de bactéries acétiques ; le grain étudié par ces auteurs en est dépourvu. La population de bactéries acétiques du grain KJ était plus abondante que dans les grains étudiés par Garrote *et al.* (2001) où elle est comprise entre 2,5 . 10⁵ cfu.g⁻¹

et $3,6 \cdot 10^5$ cfu.g⁻¹. Bien qu'identifiés dans des grains de kéfir (Angulo *et al.*, 1993 ; Lin *et al.*, 1999a ; Garrote *et al.*, 2001 ; Witthuhn *et al.*, 2004 ; Mainville *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2008), les leuconostocs n'ont, à ma connaissance, jamais fait l'objet d'une quantification.

Les dénombrements de lactobacilles, de coques lactiques et de levures étaient assortis d'une variabilité qui avait, en regard de la précision des méthodes appliquées, une signification biologique : elle exprimait une variabilité de l'abondance de ces groupes microbiens dans le grain.

4.2.3 *Origine de la variabilité de l'abondance des groupes microbiens*

S'agissant de concentrations microbiennes, leur variation pourrait être liée à un processus de diffusion de composés ou d'eau à partir du milieu extérieur et/ou à un processus biologique résultant de l'activité des micro-organismes du grain. Les micro-organismes contribuent en effet directement à la composition du grain en produisant de la biomasse et du kéfirane, qui est un constituant majeur de sa matrice (la Rivière & Kooiman, 1967).

Des conditions favorables à l'expression d'un processus de dilution, la répétition hebdomadaire de séjours prolongés dans de l'eau, ont conduit à une modification de la composition microbienne du grain de kéfir KJ. Dans ce cas, la concentration en lactobacilles était plus faible que celle observée dans le grain cultivé dans les conditions habituelles. Cependant, sous l'action du seul processus de dilution de la matrice, tous les groupes microbiens du grain auraient dû être affectés, ce qui n'était pas le cas.

Les modifications de composition microbienne de grains de kéfir rapportées dans la littérature sont associées à une rupture des conditions de culture : congélation des grains (Garrote *et al.*, 1997), changement de substrat (Abraham & De Antoni, 1999) ou modification de la composition du lait (Witthuhn *et al.*, 2005). Les cycles de fermentation du grain de kéfir KJ comprenaient des épisodes de rupture, d'une part, par le réajustement hebdomadaire et non quotidien du taux d'ensemencement, et d'autre part, par la prolongation de la durée d'incubation qui passait de 24 à 72 heures en fin de semaine. Cependant, le rythme des événements de maintenance et de culture entre deux échantillonnages successifs était conservé au cours du temps : ces événements et les dénombrements étaient effectués à des jours fixes de la semaine.

Les conditions ambiantes dans lesquelles les grains étaient entretenus quotidiennement étaient, par contre, non contrôlées et présentaient dès lors une source potentielle de variabilité au cours du temps. Les essais ont été effectués durant 7 semaines consécutives de mi-avril à début juin, une période sujette à des variations météorologiques de température, dans une pièce non climatisée. Le lait de renouvellement, en particulier, était préservé et manipulé à température ambiante. Parallèlement, le schéma expérimental prévoyait de placer les cultures des différents essais en même temps dans l'étuve et impliquait que les premières cultures de grains KJ entretenues, restaient à température ambiante pendant un certain temps. Ce temps et la température du lait étaient suffisants pour promouvoir une activité microbienne comme en témoignait l'abaissement du pH du lait : d'un pH initial de 6,7 le lait passait à un pH compris entre 5,3 et 6,0 (résultats non présentés). La variabilité du pH du lait mesuré avant de placer les cultures à l'étuve confirmait en outre l'incidence d'un facteur agissant en début de fermentation sur la variabilité de l'activité de la microflore du grain. Par ailleurs, les micro-organismes responsables de l'acidification primaire du kéfir, les coques lactiques (Koroleva, 1988), étaient ceux qui montraient le plus de variabilité de leur population au cours du temps. Les lactocoques, membres exclusifs de ce groupe dans le grain KJ, sont de plus connus pour leur sensibilité à la chaleur (Dellaglio *et al.*, 1994).

Parallèlement à l'inconstance du nombre de coques lactiques et, dans une moindre mesure, de levures au cours du temps, une variabilité de l'abondance de tous les groupes microbiens était mesurée entre les deux cultures individuelles du grain de kéfir KJ. L'origine de cette variabilité permanente a été déterminée par une analyse des opérations de maintenance et des conditions de culture du grain qui auraient pu différer entre les deux cultures.

Parmi les opérations de maintenance, le rinçage et l'égouttage du grain avant le renouvellement quotidien du lait étaient des actes manuels dont les intensités étaient laissées à l'appréciation de l'opérateur. La subjectivité associée à cette étape de maintenance n'était pas une source majeure de variabilité pour les lactobacilles et pour les levures : supprimée dans un essai mené en parallèle, elle ne modifiait pas leur abondance dans le grain. La suppression de cette étape ne modifiait pas, non plus, l'abondance des coques lactiques dans le grain mais, dans ce cas, la variabilité au cours du temps était tellement grande qu'elle masquait l'impact de ce facteur au niveau de la dispersion entre les doubles. Les coques lactiques, par leur localisation à la surface des grains (Rea *et al.*, 1996 ; Guzel-Seydim *et al.*, 2005), sont par

ailleurs plus susceptibles que les lactobacilles et les levures à être entraînés avec l'eau de rinçage.

Les conditions de culture appliquées aux deux cultures individuelles étaient identiques mais elles généraient, par la localisation des grains en surface et la synérèse du lait, un environnement immédiat hétérogène non contrôlé. Au sortir de l'incubateur, une partie des grains était en contact avec de l'air tandis que l'autre était en contact avec du petit lait ou du caillé. L'influence de cette hétérogénéité environnementale sur l'activité des micro-organismes du grain capables de fermenter le lactose, les bactéries lactiques dans le cas du grain de kéfir KJ, a été visualisée à l'aide d'un substrat chromogène. L'incubation du grain dans les conditions conduisant à une hétérogénéité de l'environnement immédiat entraînant aussi une distribution hétérogène des micro-organismes à sa surface tandis qu'elle était uniforme lorsque le grain était incubé dans un milieu homogénéisé. Schroevers & Britz (2003) ont comparé la microflore d'un grain de kéfir cultivé statiquement et sous agitation continue. L'écart des dénombrements microbiens effectués par ces auteurs est plus faible sous agitation continue mais les données disponibles ne permettent pas d'entériner statistiquement l'influence positive de l'homogénéisation du milieu sur la variabilité de la microflore du grain.

L'homogénéisation du lait pendant l'incubation est un fait rarement mentionné, tant dans les descriptions de préparation traditionnelle du kéfir que dans celles de culture expérimentale de grains de kéfir. Seuls, à ma connaissance, trois documents font référence à une pratique de culture comprenant une homogénéisation du lait. Il s'agit dans deux cas d'agitations ponctuelles occasionnelles du lait (Lacrosse, 1981 ; Simova *et al.*, 2002) et dans un cas d'une agitation continue (Guzel-Seydim *et al.*, 2005). Ceci suppose qu'usuellement, le kéfir est préparé et les grains sont reproduits en culture statique. L'application d'une culture sous agitation continue ne semble pas modifier la structure des grains: le grain expérimenté par Schroevers & Britz (2003) conserve au terme de 22 jours la morphologie typique en forme de chou-fleur mais cette même étude tend à montrer qu'elle modifie ses compositions chimique et microbienne.

Les conditions de culture appliquées pour propager des grains en vue de l'étude de leur microflore sont diverses et parfois imprécises ou non précisées : les taux d'ensemencement varient de 0,1 % (p/v) à 10-12 % (Pintado *et al.*, 1996 ; Rea *et al.*, 1996 ; Abraham & De Antoni, 1999 ; Garrote *et al.*, 2001 ; Simova *et al.*, 2002 ; Witthuhn *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*,

2008) ou ne sont pas mentionnés (Rea *et al.*, 1996 ; Takizawa *et al.*, 1998 ; Guzel-Seydim *et al.*, 2005 ; Mainville *et al.*, 2006) tandis que la température d'incubation est comprise entre 18-20 °C et 25 °C lorsqu'elle est contrôlée (Rea *et al.*, 1996 ; Takizawa *et al.*, 1998 ; Abraham & De Antoni, 1999 ; Garrote *et al.*, 2001 ; Simova *et al.*, 2002 ; Witthuhn *et al.*, 2004 ; Guzel-Seydim *et al.*, 2005 ; Mainville *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2008), et est déterminée par la température ambiante dans le cas contraire (Pintado *et al.*, 1996). La durée d'incubation varie de 20 à 48 heures (Abraham & De Antoni, 1999 ; Garrote *et al.*, 2001 ; Simova *et al.*, 2002 ; Witthuhn *et al.*, 2004 ; Mainville *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2008), ou est déterminée par la fréquence de renouvellement du lait (Pintado *et al.*, 1996 ; Guzel-Seydim *et al.*, 2005), ou par la formation d'un caillé (Rea *et al.*, 1996). Les conditions appliquées au grain de kéfir KJ en divergeaient néanmoins par le taux d'ensemencement qui était plus élevé.

L'étude conduite par Simova *et al.* (2002), avec un taux d'ensemencement de 10 % et 3 à 5 agitations en cours de fermentation, repose sur des mesures ponctuelles, non répétées dans le temps, de cultures individuelles de grains d'une même origine. Calculés à partir des données des auteurs, les écarts types relatifs géométriques des dénombrements de lactobacilles, de coques lactiques et de levures du grain sont dans ce cas respectivement de 32 %, 18 % et 57 %. Ces chiffres expriment une variabilité comparable à celle observée entre les deux cultures individuelles du grain de kéfir KJensemencées à raison de 20 % et laissées au repos. L'absence de données relatives à la précision des méthodes de dénombrement utilisées par Simova *et al.* (2002) ne permet toutefois pas de garantir que la variabilité calculée à partir des données de ces auteurs a une signification biologique.

4.3 Identification moléculaire des bactéries lactiques du grain de kéfir KJ

Les bactéries lactiques du grain de kéfir KJ ont été identifiées par une approche moléculaire indépendante d'isolements bactériens, basée sur l'analyse de la séquence nucléotidique de l'ADNr 16S.

La composition de la flore lactique des grains de kéfir est le plus souvent déterminée à partir des micro-organismes qui en ont été isolés sur des milieux de culture sélectifs. Parmi les études recensées, celles faisant appel à une méthode indépendante d'isolements bactériens sont au nombre de trois : il s'agit des études de Garbers *et al.* (2004), de Wang *et al.* (2006) et de Chen *et al.* (2008). Les résultats des études de Garbers *et al.* (2004) et de Wang *et al.* (2006) reposent exclusivement sur des méthodes indépendantes d'isolements bactériens tandis

que ceux de Chen *et al.* (2008) reposent à la fois sur une méthode dépendante et sur une méthode indépendante de cultures bactériennes.

4.3.1 Pertinence du choix de l'approche

Par rapport à la démarche classique, l'indépendance vis-à-vis d'isolements bactériens de l'approche adoptée présente un avantage technique de rapidité et, surtout, un avantage qui peut avoir des répercussions sur la qualité des résultats : elle contourne les difficultés liées à la croissance des micro-organismes sur des milieux de synthèse (Ninane *et al.*, 2007).

Appliquée au grain de kéfir KJ, l'approche moléculaire a permis d'y détecter la présence de *Lactobacillus parakefiri*, une espèce spécifique du kéfir rarement isolée : seule une équipe (Garrote *et al.*, 2001) indépendante de celle des auteurs qui ont décrit ce taxon (Takizawa *et al.*, 1994 ; Takizawa *et al.*, 1998) l'a isolée. On ne peut préjuger de la présence de cette espèce dans les autres grains mais l'examen des conditions expérimentales des études recensées laissent penser que son absence dans ces grains pourrait être liée au choix des milieux de culture utilisés pour en isoler les micro-organismes. Le milieu de culture favorable à la croissance de *Lb. parakefiri* et qui a permis à Takizawa *et al.* (1994) de révéler l'existence de cette espèce n'est pas utilisé par les autres équipes de recherche. Witthuhn *et al.* (2004) rapportent par ailleurs avoir observé, dans des grains de kéfir, des micro-organismes incapables de se développer sur les milieux de culture qu'ils avaient sélectionnés.

De nombreuses méthodes d'identification moléculaire applicables directement à l'échantillon, sans isolement préalable des micro-organismes sur des milieux de culture, sont décrites.

Certaines reposent sur la réponse d'une réaction moléculaire amorcée par une molécule spécifique à l'organisme ciblé ; l'hybridation de l'ADN avec des sondes ou des amorces spécifiques (Klijn *et al.*, 1991 ; Tilsala-Timisjärvi & Alatossava, 1997) en est un exemple courant. Ces techniques ne sont toutefois applicables qu'à un nombre limité d'espèces déterminées.

D'autres approches reposent sur la comparaison d'éléments permettant de distinguer les molécules de l'ADN ciblé entre elles : profil de restriction enzymatique de l'ADN amplifié (Ward *et al.*, 1998 ; Delfederico *et al.*, 2006), profil de migration de l'ADN amplifié en gradient de gel dénaturant (Fasoli *et al.*, 2003 ; Theunissen *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2008),

séquences nucléotidiques de l'ADN (Woo *et al.*, 2002 ; Florez & Mayo, 2006 ; Wang *et al.*, 2006) entre autres. Dans ces cas, le champ d'application est conditionné par l'étendue de la collection d'éléments de référence disponible. L'analyse de la séquence nucléotidique de l'ADN présente de ce point de vue un avantage par la disposition d'une collection publique de séquences d'origine connue, facilement accessible par le réseau Internet.

Indépendantes d'une sélection prédéterminée des espèces recherchées, ces dernières permettent en outre de révéler, le cas échéant, la présence de nouvelles espèces ou de bactéries inhabituelles dans l'environnement considéré. Le cas n'était pas avéré dans le grain de kéfir KJ ; toutes les espèces mises en évidence étaient connues et avaient été isolées de grains de kéfir antérieurement (Takizawa *et al.*, 1998 ; Lin *et al.*, 1999a ; Garrote *et al.*, 2001 ; Simova *et al.*, 2002 ; Witthuhn *et al.*, 2004 ; Mainville *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2008). L'atout majeur de ces approches s'est par contre concrétisé dans l'étude de Garbers *et al.* (2004) par l'identification, dans des grains de kéfir, de lactobacilles connus mais qui n'avaient jamais été isolés de grains de kéfir auparavant : *Lactobacillus crispatus* et *Lb. gallinarum*. Les bactéries "inhabituelles" que ce type d'approche permet de mettre en évidence peuvent aussi se révéler indésirables ; c'est une contamination de leurs grains par *Sphingobacterium* sp., *Acinetobacter* sp. et *Enterobacter* sp., ou par *Pseudomonas* sp., que Wang *et al.* (2006), ou Chen *et al.* (2008) dans le cas du *Pseudomonas* sp., ont ainsi découvert.

4.3.2 *Domaine d'application de la cible moléculaire*

La cible moléculaire de l'approche appliquée au grain de kéfir, le gène de l'ARNr 16S, est à la base de l'étude des relations phylogéniques entre bactéries, entreprise par Woese en 1987 puis utilisées comme base de classement dans la seconde édition du "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" (2005), et est intégrée dans les schémas modernes de taxonomie polyphasique (Vandamme *et al.*, 1996).

En matière d'identification moléculaire toutefois, l'appartenance de deux bactéries à une espèce commune reste déterminé par leur taux d'hybridation ADN-ADN (Wayne *et al.*, 1987 ; Stackebrandt *et al.*, 2002). Par rapport à ce critère, le pouvoir discriminant de la molécule d'ARNr 16S est parfois limité. Certaines séquences quasiment identiques de l'ARNr 16S proviennent d'espèces distinctes ; le cas est notamment rapporté pour l'ARNr 16S de *Bacillus globisporus* et *B. psychrophilus* (Fox *et al.*, 1992).

En ce qui concerne les bactéries lactiques, les séquences de l'ARNr 16S des 55 espèces analysées par Collins *et al.* (1991) sont différentes entre elles mais présentent parfois de fortes similitudes. Parmi les séquences pour lesquelles le degré de similitude est chiffré, celles provenant de *Lactobacillus amylovorus* et d'un autre lactobacille appartenant au complexe de *Lb. acidophilus*, atteignent 99,3 % d'homologie (Collins *et al.*, 1991). Au sein du groupe ciblé pour identifier les bactéries lactiques du grain de kéfir KJ, les ADNr 16S les plus proches présentent 97,2 % d'homologie ; ils proviennent de *Lb. kefiranofaciens* et de *Lb. helveticus* (Collins *et al.*, 1991).

Au niveau de la sous-espèce, la molécule de l'ADNr 16S a un pouvoir de résolution taxonomique variable (Vandamme *et al.*, 1996). Dans le cas du groupe bactérien ciblé, elle autorise la différenciation des sous-espèces *lactis* et *cremoris* de *Lactococcus lactis* (Ward *et al.*, 1998) mais ne permettait pas de différencier les sous-espèces de *Lactobacillus kefiranofaciens* et de *Leuconostoc mesenteroides*.

L'approche d'identification moléculaire appliquée aux bactéries lactiques du grain de kéfir KJ était basée sur l'analyse de courtes séquences ciblées de l'ADNr 16S et non sur celle de l'entièreté de la molécule. Elle reposait sur la distribution inégale des différences nucléotidiques entre les séquences de l'ADNr 16S des micro-organismes. Les différences entre les ARN 16S des micro-organismes ne sont en effet pas uniformément réparties dans la molécule mais sont concentrées en certaines régions (Neefs *et al.*, 1993).

4.3.3 Adéquation des courtes séquences de l'ADNr 16S à l'identification des bactéries ciblées

Les régions de l'ADNr 16S présentant le plus de variabilité entre les membres du groupe bactérien ciblé ont été identifiées en comparant des séquences d'espèces lactiques rapportées comme étant constitutives de grains de kéfir. Trois régions de l'ADNr 16S ont été identifiées ; elles correspondent aux régions variables V1, V2 et V3 décrites par Neefs *et al.* (1993).

La région V1 de l'ADNr 16S présentait le plus de variabilité entre les séquences examinées. Au sein des lactobacilles et des coques lactiques, les différences entre les espèces affectaient dans cette région un nombre de nucléotides qui devait raisonnablement permettre de les distinguer l'une de l'autre. Kullen *et al.* (2000) posent la même hypothèse pour des

espèces qui diffèrent parfois, dans cette région de l'ADNr 16S, par un nombre plus petit de nucléotides : celles autrefois associées au complexe de *Lactobacillus acidophilus*. Appliquée à diverses souches de leur collection, l'identification moléculaire basée sur cette hypothèse concorde avec l'identification présumée des souches de *Lb. acidophilus*, de *Lb. crispatus* et de *Lb. gallinarum*, tandis qu'elle concorde avec une souche sur deux de *Lb. amylovorus* (Kullen *et al.*, 2000). Les données de ces auteurs montrent par contre que l'identification moléculaire des souches de *Lb. gasseri* et de *Lb. johnsonii* diverge de l'identification présumée ou est incertaine en regard du faible taux d'homologie entre les séquences de ces souches avec celles des souches types. Toutefois, l'absence d'indications méthodologiques quant à l'identification préalable de ces souches laisse planer un doute sur la certitude de celle-ci. Les espèces de ce groupe microbien ne peuvent en effet pas être identifiées sur la seule base phénotypique (Hammes & Vogel, 1995).

La variabilité de la région V1 est par ailleurs exploitée pour déterminer la séquence de sondes et d'amorces spécifiques permettant d'identifier des espèces lactiques. C'est précisément le cas pour *Lactobacillus acidophilus* (Walter *et al.*, 2000) dont la séquence présentait le moins de différences avec celles des autres lactobacilles constitutifs de grains de kéfir. C'est aussi le cas pour d'autres espèces associées à des produits laitiers : les amorces et sondes d'identification spécifique de *Lb. brevis*, de *Lb. fermentum*, de *Lb. kefir*, de *Lb. paracasei* et de *Lb. plantarum* (Ehrmann, 1994²⁹ ; Vogel *et al.*, 1994 ; Ward & Timmins, 1999 ; Chagnaud *et al.*, 2001) ainsi que de *Lactococcus lactis* et de *Lc. raffinolactis* (Klijn *et al.*, 1991) sont déterminées dans la région V1.

Les régions V1 de deux espèces de leuconostocs étaient par contre identiques, rendant impossible leur identification sur cette base. La région de l'ADNr 16S montrant le taux de variabilité le plus élevé après la région V1, était la région V3. C'est aussi dans cette région V3 que Klijn *et al.* (1991) déterminent des amorces d'amplification génique spécifiques à l'identification de leuconostocs au niveau de l'espèce. Cependant, l'alignement des régions V2 et V3 de séquences provenant exclusivement de leuconostocs montrait une plus grande

²⁹ Ehrmann M. (1994). Klassifizierung und identifizierung van milchsäurebakterien mit hilfe molekularbiologischer methoden. PhD thesis, Technical University of Munich, Munich, Germany. Cité par : Schleifer *et al.*, 1995

variabilité des nucléotides au sein de la région V2. Prises deux à deux, les différences entre les espèces affectaient plus de nucléotides dans la région V2 que dans la région V3.

4.3.4 Degré de confiance de l'identification moléculaire

Le pouvoir discriminant des régions V1 et V2 de l'ADNr 16S a été établi pour un groupe déterminé de bactéries lactiques. Ce dernier incluait toutes les espèces rapportées comme constitutives de grains de kéfir à l'exception de *Lactobacillus crispatus* et de *Lb. gallinarum*. Ces dernières font toutefois parties des espèces associées au complexe de *Lb. acidophilus* dont les régions V1 ont été examinées sous l'angle d'un outil d'identification par Kullen *et al.* (2000). Parmi les séquences V1 examinées par ces auteurs, celles provenant de *Lb. crispatus*, de *Lb. gallinarum* et de *Lb. acidophilus* sont différentes et ont conduit à une identification correcte de diverses souches de leur collection (Kullen *et al.* 2000).

Les régions V1 et V2 des séquences de l'ADNr 16S examinées permettaient de différencier les bactéries lactiques ciblées. L'examen des régions V1 et V2 portait cependant sur un nombre limité de séquences représentatives de l'espèce et ne prenait dès lors pas en compte la variabilité des séquences au sein de chacune d'elles.

Par rapport à la variabilité des régions V1 et V2 de l'ADNr 16S des bactéries lactiques ciblées, l'identification moléculaire de l'origine bactérienne était néanmoins acceptable pour la plupart des séquences du grain de kéfir KJ. C'était le cas pour celles assignées à *Lactobacillus kefiranofaciens*, à *Lb. kefiri*, à *Lb. parakefiri* et à *Lactococcus lactis*. Elle était par contre incertaine pour les trois séquences de la région V2 assignées à *Leuconostoc mesenteroides*.

L'identification moléculaire était par ailleurs confirmée par l'identification phénotypique traditionnelle d'isolats bactériens provenant du grain de kéfir KJ.

4.3.5 Sensibilité de la méthodologie

La méthodologie appliquée reposait sur l'identification préalable des groupes lactiques du grain KJ par une approche classique basée sur leur capacité à croître sur des milieux de culture sélectifs. La diversité des groupes considérés reposait sur les descriptions antérieures de grains de kéfir et la justesse de la réponse, sur le choix des milieux de culture.

Wang *et al.* (2006) et Chen *et al.* (2008) ont exploré la diversité d'un grain de kéfir par une approche moléculaire indépendante de ces deux facteurs déterminants. Comparées aux données obtenues par la voie classique (Ottogalli *et al.*, 1973 ; Angulo *et al.*, 1993 ; Pintado *et al.*, 1996 ; Lin *et al.*, 1999a ; Garrote *et al.*, 2001 ; Simova *et al.*, 2002 ; Mainville *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2008), celles obtenues par Wang *et al.* (2006) révèlent une plus grande richesse du grain en bactéries contaminantes mais pas en bactéries lactiques ; elles y sont uniquement représentées par des lactobacilles. Dans l'étude de Chen *et al.* (2008), la diversité des groupes lactiques mise en évidence avec la méthode indépendante d'isolements bactériens est moindre que celle mise en évidence avec la méthode classique d'isolements bactériens dans deux grains sur trois, et équivalente dans un des trois grains. Dans ce cas, la méthode indépendante d'isolements bactériens a révélé la présence d'un groupe non identifié par la méthode classique, les coques lactiques, mais a, parallèlement, omis celle d'un autre groupe, les leuconostocs.

Dans la méthode utilisée par Wang *et al.* (2006) et par Chen *et al.* (2008), l'ADNr 16S amplifié provient de l'ensemble du consortium bactérien du grain et les fragments d'ADNr 16S d'origines différentes sont séparés par migration en gradient de gel dénaturant (DGGE). Fasoli *et al.* (2003) montrent qu'en dessous d'une quantité équivalente à 1 % de la flore totale, une bactérie lactique ajoutée à du lait fermenté n'est pas détectée par cette méthode. La sensibilité de la méthode n'aurait dès lors pas permis de détecter la présence des coques lactiques et des leuconostocs dans le grain de kéfir KJ.

Dans l'approche moléculaire adoptée pour identifier les bactéries lactiques du grain KJ, l'ADNr 16S des populations minoritaires en terme d'unités viables, les coques lactiques et les leuconostocs, était examiné séparément de celui de la population dominante, les lactobacilles. Au sein de chacune des populations, le niveau de détection des espèces était déterminé par le nombre de fragments clonés analysés. Celui-ci avait été calculé pour détecter avec une probabilité de 95 % les espèces dont l'abondance au sein de chacune des populations, les lactobacilles et les coques lactiques plus les leuconostocs, pouvait différer respectivement d'un facteur 10 et d'un facteur 4. Le nombre de fragments clonés analysés était ainsi théoriquement suffisant pour détecter avec une probabilité de 95 % les espèces dominantes en terme d'unités viables de toutes les composantes des populations ciblées : lactobacilles homofermentaires et hétérofermentaires pour les uns, coques lactiques et leuconostocs pour les autres.

Cette assertion théorique supposait une amplification égale de chacune des molécules d'ADNr 16S présentes dans le pool d'ADN génomique. Cependant, dans un mélange de molécules d'ADNr 16S, l'amplification peut-être sélective vis-à-vis de l'une ou l'autre d'entre-elles (Reysenbach *et al.*, 1992 ; Ercolini *et al.*, 2003). L'absence d'une telle sélectivité n'a pas été vérifiée dans le cadre de cette étude et l'éventualité d'une sélectivité vis-à-vis de l'ADNr 16S provenant d'un membre du consortium microbien du grain KJ ne peut être écartée.

Appliquée au grain KJ, la méthode a néanmoins effectivement permis d'identifier des espèces appartenant à chacune des composantes visées. Elle a de surcroît permis d'identifier deux espèces de la composante décrite comme représentant 10 % de la population concernée dans les grains de kéfir : les lactobacilles hétérofermentaires (Kandler & Kunath, 1983).

4.4 Composition microbienne du grain de kéfir KJ

Le grain de kéfir KJ incluait des bactéries lactiques, des levures et des bactéries acétiques. Sauf exception pour un des grains de Witthuhn *et al.* (2004), qui relève vraisemblablement de problèmes techniques et non de la composition du grain, les bactéries lactiques et les levures sont des groupes microbiens toujours représentés dans les grains de kéfir (Ottogalli *et al.*, 1973 ; Angulo *et al.*, 1993 ; Pintado *et al.*, 1996 ; Lin *et al.*, 1999a ; Garrote *et al.*, 2001 ; Simova *et al.*, 2002). Au contraire de ceux-ci, les bactéries acétiques ne font pas nécessairement parties des consortiums de grain identifiés ; c'est le cas pour certains grains de Ottogalli *et al.* (1973) et d'Angulo *et al.* (1993) ainsi que pour celui de Pintado *et al.* (1996) et pour ceux de Witthuhn *et al.* (2004). Ce groupe microbien jouerait néanmoins un rôle important dans la préservation du grain (Koroleva, 1988).

Les taxons identifiés dans le grain de kéfir KJ incluait les bactéries lactiques *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lb. kefir*, *Lb. parakefir*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Leuconostoc mesenteroides* ; la levure *Kazachstania exigua* et la bactérie acétique *Acetobacter* sp.

4.4.1 Bactéries lactiques

Caractéristiques taxonomiques

La composition du grain KJ en bactéries lactiques était proche de celle des grains décrits par Mainville *et al.* (2006) et par Chen *et al.* (2008) au niveau de l'espèce ; ces grains comprennent, à l'instar du grain KJ, les espèces *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lb. kefir*, *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc mesenteroides*. Elle en différait uniquement par la présence dans le grain KJ de *Lb. parakefiri* qui fait défaut dans les grains décrits par ces auteurs. La présence, simultanée et exclusive au niveau des *Lactobacillus* sp., de *Lb. kefiranofaciens*, de *Lb. kefir* et de *Lb. parakefiri* dans un grain de kéfir est par contre décrite dans une étude consacrée à ce genre lactique, celle de Takizawa *et al.* (1998).

Les espèces *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lb. kefir* et *Lb. parakefiri* ont, à ma connaissance, exclusivement été isolées de kéfir ou de grains de kéfir et sont à ce titre spécifiques du kéfir.

Au niveau de la sous-espèce, la composition du grain de kéfir KJ différait de celle du grain de Mainville *et al.* (2006) par l'absence de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et de celle du grain de Takizawa *et al.* (1998) par l'absence de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*.

Production de kéfirane

Pour être fonctionnel, le consortium doit inclure des bactéries productrices de kéfirane, le polysaccharide typique du kéfir et constitutif de la matrice des grains de kéfir (la Rivière & Kooiman, 1967). Les souches pour lesquelles une production de kéfirane a jusqu'à présent été établie appartiennent à deux taxons qui n'ont pas été identifiés dans le grain KJ : *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* et *Lb. brevis* (la Rivière & Kooiman, 1967 ; Fujisawa *et al.*, 1988).

Les deux sous-espèces de *Lactobacillus kefiranofaciens*, *kefirgranum* et *kefiranofaciens*, étaient indistinguables sur base de l'analyse de l'ADNr 16S, même dans d'autres régions que celle examinée : les séquences complètes de leur ADNr 16S étaient identiques. L'identification plus précise de *Lb. kefiranofaciens* détectée dans le grain de kéfir KJ a été effectuée à partir du profil fermentaire d'isolats bactériens provenant du kéfir KJ. Les représentants de *Lb. kefiranofaciens* isolés du kéfir KJ appartenaient tous à la sous-espèce

kefirgranum ; aucun représentant de la sous-espèce *kefiranofaciens* de *Lb. kefiranofaciens*, décrite par Fujisawa *et al.* (1988) comme produisant du kéfirane, n'a été isolée à partir du kéfir KJ. Une omission par inadéquation du milieu de culture utilisé est improbable du fait de l'utilisation de celui adapté par Toba *et al.* (1986) pour favoriser la croissance des bactéries mucoïdales du kéfir, associées à la production de kéfirane, et qui est à l'origine de l'isolement primaire de *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* par Fujisawa *et al.* (1988). Sur ce milieu de culture, les souches de *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* isolées du grain KJ produisaient de l'exopolysaccharide. Une production d'exopolysaccharide par ce taxon est indirectement suggérée par Vancanneyt *et al.* (2004) au travers de la description de sédiments floconneux qu'il forme mais n'a, à ma connaissance, jamais été décrite explicitement. *A fortiori*, la nature de l'exopolysaccharides produit par ce taxon est indéterminée. Il n'est dès lors pas exclu, par la parenté de *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* avec le producteur avéré de kéfirane, que l'exopolysaccharide produit par les souches isolées du grain KJ soit du kéfirane.

Il est par ailleurs probable que la bactérie productrice de kéfirane isolée et identifiée comme *Lactobacillus brevis* par la Rivière & Kooiman (1967) appartienne à l'espèce *Lb. kefiri*. Les auteurs à l'origine de la description de *Lb. kefiri*, Kandler & Kunath (1983), rapportent en effet que le profil fermentaire des isolats de cette nouvelle espèce est identique à celui d'une souche provenant de kéfir (DSM 20485) et identifiée à l'époque comme *Lb. brevis*. La distinction entre *Lb. kefiri* et *Lb. brevis* porte sur leur ADN, aspect qui n'était pas examiné à l'époque et en particulier pas par la Rivière & Kooiman (1967) lors de l'identification de leur isolat producteur de kéfirane.

Diversité

La diversité des bactéries lactiques identifiées dans le grain de kéfir KJ comprenait 5 espèces : 3 lactobacilles, 1 coque lactique et 1 leuconostoc. Elle comprenait un plus petit nombre d'espèces lactiques que le grain de Simova *et al.* (2002) qui inclut 4 lactobacilles et 2 coques lactiques. Elle comprenait également un plus petit nombre de coques lactiques qu'un des grains de Angulo *et al.* (1993) qui en inclut aussi 2 espèces. Elle était néanmoins égale ou supérieure à celle mise en évidence dans tous les autres grains dont la population bactérienne lactique a fait l'objet d'une caractérisation étendue (Ottogalli *et al.*, 1973 ; Angulo *et al.*, 1993 ; Garrote *et al.*, 2001 ; Mainville *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2008) et restait à cet égard représentative de la diversité lactique des grains de kéfir au niveau de l'espèce.

4.4.2 Levures

Kazachstania exigua, la levure isolée du grain de kéfir KJ, est une levure présente dans d'autres grains de kéfir : Angulo *et al.* (1993) et Witthuhn *et al.* (2004) en ont isolé dans, respectivement, un et deux de leurs grains. C'est une levure incapable de fermenter le lactose comme la plupart des levures identifiées dans des grains de kéfir, à savoir *Candida friedrichii*, *Candida inconspicua*, *Candida maris*, *Candida tenuis*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Torasporula delbrueckii*, *Yarrowia lipolytica* et *Zygosaccharomyces* sp. (Ottogalli *et al.*, 1973 ; Angulo *et al.*, 1993 ; Pintado *et al.*, 1996 ; Lin *et al.*, 1999a ; Barnett *et al.*, 2000 ; Simova *et al.*, 2002 ; Witthuhn *et al.*, 2004).

La présence d'une unique espèce de levure dans les grains de kéfir, comme c'est le cas pour le grain KJ, est fréquente : pas moins de 11 grains sur les 26 décrits dans la littérature examinée (Ottogalli *et al.*, 1973 ; Angulo *et al.*, 1993 ; Pintado *et al.*, 1996 ; Lin *et al.*, 1999a ; Garrote *et al.*, 2001 ; Simova *et al.*, 2002 ; Witthuhn *et al.*, 2004) ne renferment qu'une seule espèce de levure. Cependant, certains peuvent en contenir 3 ou 4, voire jusqu'à 7 pour l'un d'entre-eux, et, par rapport à ces derniers, la diversité du grain KJ en levures paraît faible.

4.4.3 Bactéries acétiques

Lorsqu'elles sont présentes dans des grains de kéfir, les bactéries acétiques appartiennent, comme c'est le cas de celle du grain KJ, au genre *Acetobacter*.

4.5 Formation du grain de kéfir KJ

Jamais un grain de kéfir n'a, à ma connaissance, pu être constitué *in vitro* à partir de cultures microbiennes. Les grains sont jusqu'à présent reproduits par fragmentation (Koroleva, 1988). Naturellement ou mécaniquement, des morceaux se détachent d'un grain existant et grossissent pour fournir à leur tour de petits grains.

4.5.1 Constitution *in vitro* d'une structure de Gingerbeer plant : applicabilité aux grains de kéfir

Les Gingerbeer plant sont des associations de bactéries lactiques et de levures utilisées pour fermenter de l'eau sucrée. Elles se présentent sous la forme de petites masses translucides qui ont, à l'instar des grains de kéfir, la propriété de se multiplier.

Pidoux (1988 & 1989) a isolé du consortium de Gingerbeer plant une souche bactérienne capable de produire un dextrane insoluble qui forme un gel. Cette structure bactérienne figée a la particularité de prendre la forme de la structure mère lorsqu'elle est cultivée sur un milieu gélosé.

La souche capable de produire ce dextrane insoluble appartient à un taxon, *Lactobacillus hilgardii*, qui ne fait pas partie du consortium identifié dans les grains de kéfir (Ottogalli *et al.*, 1973 ; Angulo *et al.*, 1993 ; Pintado *et al.*, 1996 ; Takizawa *et al.*, 1998 ; Lin *et al.*, 1999a ; Garrote *et al.*, 2001 ; Simova *et al.*, 2002 ; Witthuhn *et al.*, 2004 ; Mainville *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'exopolysaccharide cohésif de la matrice des grains de kéfir est du kéfirane et non du dextrane (la Rivière & Kooiman, 1967).

Plusieurs souches produisant du kéfirane ont été isolées de grains de kéfir (la Rivière *et al.*, 1967 ; Toba *et al.*, 1986 ; Toba *et al.*, 1987 ; Yokoi *et al.*, 1990). Le kéfirane qu'elles produisent, de même que celui extrait de la matrice des grains est un exopolysaccharide soluble (Kooiman, 1968). Le kéfirane en solution gélifie à une température de 5° C en un gel mou qui acquiert de la fermeté en présence d'alcool et plus encore en présence simultanée d'alcool et de caséine (Mukai *et al.*, 1991). Dans le grain de kéfir KJ l'expression de cette propriété était liée à l'activité microbienne. La solubilité du kéfirane de la matrice des grains se manifestait lors des essais par la "disparition" de fragments du grain de kéfir KJ dans du lait. Dans les conditions usuelles de fermentation du kéfir, l'ajout d'alcool au lait n'améliorait pas la préservation des fragments de grain. Celle-ci était améliorée lorsque, en présence d'alcool, les conditions d'atmosphère stimulaient la croissance des lactobacilles ou lorsque les conditions de culture stimulaient simultanément la production locale d'alcool par les levures et la croissance des lactobacilles. Ces observations laissent penser que la transformation du kéfirane en gel ferme et son maintien au sein des grains résultent d'une dynamique microbienne plus complexe que celle des Gingerbeer plant.

4.5.2 *Processus de formation par croissance d'ébauches de grain*

D'après la description de la formation des grains de kéfir *in situ* faite par Beijerinck (1889³⁰), les grains de kéfir se forment sur les parois des barriques en bois servant à la

³⁰ Beijerinck M.W., 1889. Sur le kéfir. *Arch. Néerl. Sci. Exactes Nat.* **23**, 428-444. Cité par : Pidoux, 1984.

préparation du kéfir. La formation de structures microbiennes sur des surfaces solides est bien connue dans les milieux aquatiques. Elle est décrite comme un processus séquentiel (Lasa, 2006) : des bactéries libres se fixent sur la surface et y prolifèrent, elles produisent ensuite la matrice exopolysaccharidique, les premières ébauches de l'architecture du biofilm apparaissent puis la structure évolue vers une architecture mature. Lorsque la structure du biofilm est mature, des bactéries s'en détachent pour coloniser le support. Au contraire des biofilms, les grains de kéfir ne semblent pas coloniser le support : Beijerinck (1889), en précisant l'apparition "*ça et là*" des grains, décrit un événement sporadique. Néanmoins, dans l'hypothèse où les grains de kéfir se forment selon un processus analogue à celui de l'établissement de ces biofilms, leur formation donnerait naissance à des ébauches de grain de petite dimension évoluant vers de plus grosses structures de grain matures.

Dans des conditions expérimentales simulant les conditions de formation de grain *in situ*, le consortium microbien du grain de kéfir KJ ne formait pas de structures microbiennes s'apparentant à des grains.

4.5.3 Adéquation des essais à l'établissement d'un processus de formation par croissance d'ébauches de grain

Dans ces essais, du caillé de première fermentation, frais et séché, était préservé au cours de repiquages successifs dans du lait. Dans les milieux aquatiques, la formation de certaines structures microbiennes est décrite comme un processus impliquant une mobilité microbienne (Filloux & Vallet, 2003 ; Dingding *et al.*, 2006 ; Picioreanu *et al.*, 2007). Ce type de processus est le fruit de micro-organismes capables de se déplacer activement dans le milieu. Le consortium du grain de kéfir KJ comprenait un membre doté de cette capacité : *Acetobacter* sp. (résultat non présenté). La mobilité des micro-organismes intervient à deux stades de la formation des biofilms : au stade de l'adhésion initiale à la surface solide et au stade de l'élaboration de l'architecture du biofilm. Le grain de kéfir est, au contraire de ces biofilms aquatiques, une structure compacte au sein de laquelle il est peu probable que le micro-organisme, *Acetobacter* sp., puisse se déplacer. Il n'est par contre pas exclu que sa mobilité ait un rôle au stade de la fixation du biofilm sur la paroi. Dans cette hypothèse, l'adhésion de *Acetobacter* sp. aux parois des barriques devait avoir lieu avant que le micro-organisme soit immobilisé dans les caillés. La phase expérimentale autorisant cette mobilité était la formation des caillés primaires.

Lors de cette phase, la fermentation du laitensemencé avec des extraits du grain de kéfir KJ aboutissait à une prise en masse du lait au terme de 2 semaines d'incubation. L'adhésion des bactéries et la formation subséquente d'un biofilm est décrite par Costerton & Lewandowski (1995) comme un processus rapide. Le consortium microbien du grain de kéfir KJ formait, dans des essais indépendants, des structures microbiennes en 2 semaines. Dans ce laps de temps, il en formait dans des bouillons de synthèse ainsi que dans du lait incubé dans des conditions similaires à celles appliquées pour former les caillés primaires. Ces structures ne s'apparentaient pas à des grains de kéfir mais elles témoignaient de la rapidité de la formation d'une organisation microbienne par ce consortium. Par ailleurs, *Lactobacillus hilgardii* forme *in vitro* des structures similaires à celles des grains matures de Gingerbeer plant en 10 jours (Pidoux, 1989).

Un mécanisme de régulation du comportement des communautés microbiennes lié à leur densité de population, appelé *quorum sensing*, intervient dans la formation de divers biofilms (Hentzer *et al.*, 2004). L'association des micro-organismes en communauté structurée est dans ces cas déterminée par la concentration dans le milieu en molécules "de communication" qu'elles produisent. Lorsque la densité de population microbienne croît dans le milieu, la concentration en ces molécules "de communication" augmente et induit, lorsqu'elle atteint un niveau suffisant, la formation du biofilm. Ces molécules "de communication" agissent sur les membres du taxon qui les produisent et aussi, pour certaines, sur ceux d'autres taxons (Diggle *et al.*, 2007). Dans l'hypothèse où un tel mécanisme de régulation déterminerait la formation des grains de kéfir, il serait conditionné par la densité microbienne du lait fermenté en membres du consortium à l'origine d'une production de molécules "de communication". Les conditions et la durée d'incubation appliquées pour former les caillés primaires mis en œuvre dans les essais de formation de grain, ainsi que la maturité des caillés, permettent de supposer que la densité microbienne globale y était au moins aussi élevée que celle déterminant la formation des grains *in situ*. La densité microbienne a toutefois pu hypothéquer un tel processus au niveau de la densité individuelle d'un, ou de plusieurs, micro-organisme(s) en présence. La densité relative (balance) des différents micro-organismes du consortium, qui était un paramètre non contrôlé, semblait en effet déterminante dans la formation de biofilms par les extraits de grain.

Selon Lacrosse (1981) la croûte spongieuse formée *in situ* sur les parois constitue, après séchage et morcellement, des grains de kéfir séchés. Dans l'hypothèse où les grains se

forment sur les parois des conteneurs comme le décrit Beijerinck (1889), cela suppose que des ébauches de grains aient été emportées avec les fragments séchés de croûte spongieuse. Cette genèse a été simulée *in vitro* en séchant du caillé formé en boîtes de Petri. Dans ce schéma expérimental, les parois des boîtes servaient de support de fixation aux grains en formation. De texture lisse, les surfaces des boîtes ne constituaient probablement pas un obstacle à ce que des ébauches de grain soient entraînées avec le caillé séché. Les supports à la fixation des ébauches de grain dans le caillé frais, simulés par des copeaux de bois, étaient conservés au cours des repiquages successifs dans du lait.

Les repiquages successifs des caillés frais et séchés devaient permettre aux ébauches de grain d'acquiescer une taille suffisante pour être décelées dans les caillés. L'accroissement des grains est décrit comme un processus lent (Beijerinck, 1889). C'est un processus qui varie d'un grain à l'autre et en fonction des conditions de culture (Kuo & Lin, 1999 ; Garrote *et al.*, 2001 ; Ninane, 2002 ; Schroevers & Britz 2003). *A priori* de même nature, les ébauches de grain et le grain mère étaient supposés avoir des rythmes de croissance similaires dans des conditions de culture comparables. Cependant, par le fait de leur proximité avec du caillé, les conditions de culture des ébauches de grain différaient de celles du grain mère cultivé dans du lait. Ceci était particulièrement avéré pour les ébauches de grain potentiellement formées sur les parois des copeaux de bois inclus dans les caillés frais. Les ébauches entraînées avec le caillé séché étaient probablement partiellement en contact avec du lait et étaient potentiellement dans des conditions plus proches de celles du grain mère. Leur rythme de croissance a été extrapolé à partir de celui du grain mère cultivé dans les mêmes conditions d'incubation et avec un taux d'ensemencement plus défavorable à la croissance. Par ailleurs, la durée de l'essai visait à l'acquisition par les ébauches de grain d'une taille surestimée. Toutefois, la durée des cycles de fermentation des ébauches était plus longue que celle du grain mère et a pu en ralentir leur croissance.

4.5.4 Adéquation du lait à la croissance d'ébauches de grain

La conception des essais reposait sur la confrontation et l'interprétation des observations sommaires relatives à la formation de grains de kéfir *in situ* relayées par Beijerinck (1889) et par Lacrosse (1981). La formation de grains matures dans un environnement de caillé était déduite de ces observations et se pouvait en être indépendante.

Elle pouvait aussi voir le jour au contact direct du substrat de fermentation, le lait. Cependant, le grain de kéfir KJ ne se développait pas, ou peu, dans du lait lorsqu'il était morcelé. En dessous d'une taille d'environ $0,3 \text{ mm}^3$, les fragments de grain ne se développaient ni dans du lait nature ni dans du lait modifié de façon à favoriser la structuration de la matrice du grain ou à simuler le contexte environnemental créé par la présence de caillottes de veau comme le précisent Beijerinck (1889) et Lacrosse (1981). Qui plus est, des structures de grain d'environ $3 \sim 6 \text{ mm}^3$ disparaissaient dans du lait ; probablement par dissolution du kéfirane, une substance cohésive majeure du grain. Des conditions de culture favorisant la gélification du kéfirane autorisaient la croissance ou la préservation de fragments 10 fois plus gros, d'une taille d'environ 3 mm^3 . Les plus petits grains matures, c'est-à-dire capables de se reproduire dans du lait et dès lors de s'y préserver, rapportés dans la littérature, ont un diamètre de 2-3 mm, c'est-à-dire un volume de 4 à 14 mm^3 (Bottazzi & Bianchi, 1980).

4.5.5 Hypothèse de formation de grains par l'intermédiaire d'un biofilm

Le consortium microbien du grain de kéfir KJ formait à la surface du lait des biofilms. Ces biofilms se formaient en conditions d'aérobiose, dans du lait additionné d'extrait de levure ou dans du lait nature selon le mode de constitution du consortium à l'origine de leur formation : extrait ensemble du grain ou reconstitué à partir des souches individuelles isolées du grain KJ. La formation de biofilms se caractérisait par une absence d'acidification et de texturation des laits fermentés.

Les descriptions de formation de grains de kéfir *in situ* rapportées par Beijerinck (1889) et par Lacrosse (1981) ne mentionnent pas la présence de biofilm mais leur occurrence n'est pas exclue. Indirectement, par l'évocation de problèmes d'altération, la description de Beijerinck (1889) laisse penser qu'il a pu y avoir, à certains moments, un défaut d'acidification et de texturation du lait fermenté. Dans ce cas, les caractéristiques liées à la présence des biofilms formés *in vitro* à partir du consortium du grain KJ, sont rencontrées.

D'après les descriptions de Beijerinck (1889) et de Lacrosse (1981) les parois des conteneurs constituent le siège de la formation des grains. Il est plausible que ces biofilms, de nature collante, aient adhérents aux parois des conteneurs à l'occasion de leur manipulation.

Par ailleurs, la morphologie de certains grains de kéfir laisse penser qu'ils pourraient provenir d'un film : certains sont décrits comme "*pouvant être déroulés en une sorte de feuille*" (Marshall & Cole, 1984).

4.5.6 Adéquation du consortium microbien à la genèse de grains

Les consortiums mis en oeuvre dans les essais de reconstitution du grain ont été préparés par dispersion de grains de kéfir KJ de façon à inclure tous les micro-organismes du grain mère et étaient *a priori* complets. Même "dispersé", le consortium du grain mère de kéfir KJ était capable de former des structures microbiennes. Les structures formées se présentaient toutefois dans ce cas sous la forme de biofilms souples et non sous la forme de grains plus consistants. Le consortium du grain KJ n'autorisait par ailleurs pas la croissance et/ou la préservation de très petites structures de grains, représentées dans les essais par des fragments du grain mère.

L'anomalie au niveau de la cohésion de la matrice de ces structures microbiennes (biofilms et fragments de grain), considérées ici comme primaires dans la genèse des grains, pourraient provenir de l'absence d'un intervenant microbien pionnier, c'est à dire d'un micro-organisme ou d'un ensemble de micro-organismes qui amorce la formation de la structure microbienne, dans le consortium du grain KJ. Un processus de colonisation séquentielle des surfaces, amorcé par un petit nombre d'espèces bactériennes pionnières puis colonisé par d'autres, a lieu notamment dans la formation de la plaque dentaire (Yoshida *et al.*, 2006). D'autres exemples de colonisation séquentielle des surfaces sont connus, notamment dans le milieu marin (Compère, 1999). Dans les cas relevés, une "disparition" des micro-organismes pionniers de la structure microbienne, comme ce serait hypothétiquement le cas dans le grain de kéfir KJ, n'est pas relatée. Cela n'exclut toutefois pas l'éventualité d'un tel évènement dans les grains de kéfir ; il s'agit de structures microbiennes qui s'écartent en de nombreux points de ces exemples.

5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était de caractériser la composition microbienne d'un grain de kéfir tant du point de vue qualitatif que quantitatif. Il incluait un aspect méthodologique par la recherche d'une stratégie d'identification bactérienne rapide et fiable, adaptée à la flore lactique de grains de kéfir.

Ce travail visait également à entamer une réflexion expérimentale en matière de reconstitution d'un grain de kéfir. Cet objectif s'inscrivait dans la perspective, qui reste d'actualité, de valider le caractère complet de l'identification microbienne du grain par comparaison du produit de fermentation du grain mère avec celui du grain reconstitué à partir des souches microbiennes qui en ont été isolées.

5.1 Caractéristiques microbiennes du grain de kéfir KJ

5.1.1 Flore contaminante

La sensibilité du grain à une contamination par des germes pathogènes a été évaluée au travers de son acidité. Dans les conditions de culture appliquées au laboratoire, l'acidité du grain de kéfir KJ était telle qu'elle permet de le qualifier de "peu sensible" à une contamination par des germes pathogènes mais n'écarte pas l'éventualité d'une telle contamination : certains pathogènes résistent à des pH proches de celui que le grain affichait.

L'innocuité de la microflore du grain de kéfir a été vérifiée, d'une part, par la recherche de germes témoignant d'un défaut d'hygiène et, d'autre part, par la recherche des germes pathogènes prévalant dans nos régions et susceptibles de tolérer l'acidité du grain. Le lait fermenté à partir du grain de kéfir KJ était exempt, dans des limites de détection déduites de la législation en vigueur ou des recommandations de la Fédération internationale de laiterie (FIL, Bruxelles), de germes indicateurs de défauts d'hygiène et de germes pathogènes. La qualité hygiénique du grain de kéfir KJ satisfaisait dès lors aux impératifs sanitaires inhérents à une distribution publique mais, étant un paramètre conditionnel, elle ne peut être considérée comme définitivement acquise.

5.1.2 Flore banale

La première étape de la caractérisation de la flore banale, non contaminante, du grain KJ visait à identifier les groupes de micro-organismes participant au consortium. Elle a été effectuée par la méthode classique d'isolement sur des milieux de culture sélectifs et reposait sur une connaissance prédéterminée de la composition microbienne de grains de kéfir : le choix des milieux de culture prenait en compte les groupes microbiens dont la présence dans des grains de kéfir est mentionnée dans la littérature. Cette étape a permis de révéler la présence, dans le grain KJ, de lactobacilles, de coques lactiques, de leuconostocs, de levures et de bactéries acétiques. Elle a, parallèlement, permis d'en écarter les pédiocoques, les microcoques et *Weissella viridescens*. La microflore banale du grain de kéfir KJ comprend ainsi tous les groupes microbiens décrits comme ayant une fonctionnalité dans la qualité du kéfir et/ou dans la constitution et la préservation des grains, et est dépourvue des groupes généralement associés à d'autres matrices alimentaires.

Les membres de la plupart des groupes microbiens révélés dans le grain KJ ont ensuite été identifiés, à un niveau taxonomique plus fin, à l'aide de plusieurs méthodes reposant sur des critères analytiques de nature différente - phénotypique, génotypique et/ou physico-chimique – de façon à asseoir la fiabilité de l'identification. Seul l'identification du groupe des bactéries acétiques reposait sur un unique critère. Toutes ces méthodes étaient indépendantes d'une connaissance prédéterminée des espèces et autorisaient, à cette étape de la caractérisation de la flore banale du grain, la mise au jour de micro-organismes inhabituels ou non encore décrits. Cette potentialité était renforcée, pour les bactéries lactiques, par l'application d'une stratégie d'identification indépendante d'isollements bactériens par culture. La flore banale identifiée dans le grain KJ comprenait exclusivement des micro-organismes habituels de grains de kéfir, c'est-à-dire qui avaient déjà été identifiés par d'autres dans des grains de kéfir et est de ce point de vue ordinaire. Elle incluait une levure incapable de fermenter le lactose, *Kazachstania exigua*, comme le sont la plupart des levures de grains de kéfir, ce qui renforce le caractère conforme du grain KJ, et les trois lactobacilles typiques du kéfir : *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lb. kefiri* et *Lb. parakefiri* qui lui confèrent un caractère d'authenticité.

La diversité des micro-organismes identifiés au sein de chacun des groupes reposait sur la morphologie des colonies développées sur les milieux de cultures et, pour les bactéries

lactiques, sur la sensibilité de la méthode moléculaire appliquée pour les identifier sans les isoler préalablement par culture. La sensibilité de la méthode moléculaire a été fixée de façon à détecter les espèces dominantes, en terme d'unités viables, de chacun des groupes de bactéries lactiques identifiés dans le grain KJ ou dont la présence était pressentie sur base des données bibliographiques (lactobacilles de types fermentaires distincts). Chacun des groupes ciblés a livré une espèce, à l'exception du groupe des lactobacilles hétérofermentaires qui en comptait deux. La méthode indépendante d'isolements par culture a permis de révéler au sein de ce groupe la présence d'un lactobacille, *Lb. parakefiri*, peu enclin à se développer sur les milieux de culture sélectionnés et dont la morphologie des colonies ne permettait pas de le distinguer des autres, plus abondants. La diversité des bactéries lactiques établies pour le grain KJ était comparable à celle des grains les plus fournis mais on ne peut en garantir le caractère complet. Le grain KJ se caractérise, par ailleurs, par une faible diversité des levures ; seule une espèce y a été identifiée alors que les grains de kéfir peuvent en contenir trois ou quatre, voire jusqu'à sept mais c'est exceptionnel.

La flore du grain KJ était dépourvue des taxons pour lesquels une production avérée de kéfirane, l'exopolysaccharide constitutif de la matrice des grains de kéfir, est démontrée : *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* et *Lb. brevis*. Cela ne compromet probablement pas la présence de producteurs de kéfirane parmi les taxons identifiés : ils incluaient *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* et *Lb. kefiri*, des taxons apparentés avec les producteurs avérés de kéfirane et dont les souches isolées du grain KJ étaient capables de produire de l'exopolysaccharide. L'identification de la nature des exopolysaccharides produits par ces souches, qui s'inscrit dans la continuité de ce travail, permettra d'asseoir cette assertion. Elle permettra parallèlement de préciser le rôle de ces exopolysaccharides dans la fonctionnalité du grain et en particulier dans la constitution de la matrice du grain. Les exopolysaccharides que les souches de *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* et de *Lb. kefiri* isolées du kéfir KJ produisaient semblaient en effet différer par leur viscosité et par leur fonctionnalité. Ce qui n'exclut pas qu'il puisse s'agir dans les deux cas de kéfirane : le polysaccharide extrait de grains de kéfir et défini comme tel présente parfois deux pics distincts en chromatographie.

Du point de vue quantitatif, la flore du grain KJ se caractérisait par une dominance des bactéries lactiques, essentiellement du fait des lactobacilles, vis-à-vis des levures et des bactéries acétiques.

5.1.3 *Variabilité quantitative de la microflore*

Les lactobacilles, les coques lactiques et les levures ont été dénombrés régulièrement pendant 7 semaines dans des échantillons de grains cultivés en parallèle. Les résultats de ces dénombrements ont montré que l'application d'une pratique de culture usuelle, conduite avec un taux d'ensemencement et des conditions d'incubation contrôlés, génère une variabilité de l'abondance microbienne du grain qui affecte inégalement les différents groupes microbiens. Cette variabilité de la composition quantitative du grain a eu des répercussions sur l'activité biosynthétique du consortium. Elle a permis de révéler l'existence de biofilms de kéfir et était à ce titre intéressante dans le cadre de ce travail. Dans d'autres perspectives expérimentales toutefois, une moindre variabilité du consortium serait préférable. Les sources potentielles de variabilité ont été identifiées pour orienter la recherche d'une pratique de culture mieux maîtrisée. Elles concernent la température initiale du lait de renouvellement des cultures, l'intensité du rinçage des grains et l'hétérogénéité de l'environnement immédiat des grains liée notamment à la pratique d'une culture statique de grain.

5.2 Atouts, contraintes et performances de la méthode moléculaire d'identification des bactéries lactiques

5.2.1 *Universalité et indépendance vis-à-vis d'une connaissance pré-déterminée des espèces recherchées*

L'outil moléculaire choisi pour identifier les bactéries lactiques du grain était l'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S. Dans l'approche adoptée, l'origine bactérienne des séquences de l'ADNr 16S était déterminée par comparaison avec des séquences d'origine connue. La disposition d'une banque publique de séquences identifiées de l'ADNr 16S, facilement accessible et équipée d'outils de comparaison performants, confère à cette approche un caractère universel, applicable dans tout laboratoire. Elle conserve un autre aspect intéressant des déterminations phénotypiques classiques : l'indépendance vis-à-vis d'une connaissance pré-déterminée des espèces recherchées, parmi le groupe bactérien ciblé.

5.2.2 Indépendance vis-à-vis d'isolements par culture

La méthode a été appliquée au consortium du grain, sans isolement préalable des micro-organismes par culture, et présente de ce fait, par rapport aux méthodes classiques, un avantage technique de rapidité. Elle gagne aussi en assurance et en possibilités exploratrices : indépendante de la croissance des micro-organismes, qui revêt pour certains d'entre eux un caractère conditionnel strict, elle permet d'éviter le risque d'omission d'espèces lié à l'incapacité des micro-organismes à se développer sur les milieux sélectionnés ou actuellement disponibles.

5.2.3 Sensibilité

L'ADNr 16S provenant des différents micro-organismes du consortium du grain a été individualisé par clonage dans *Escherichia coli*. Avec ce mode de séparation de l'ADNr 16S, la sensibilité de la méthode, c'est-à-dire la diversité microbienne identifiée, dépend du nombre de séquences analysées. Le nombre de séquences à analyser pour obtenir une sensibilité déterminée dépend des quantités relatives d'ADNr 16S issus des différents micro-organismes : il croît en fonction de l'ampleur du déséquilibre dans la balance des populations microbiennes, en terme de quantité ou copies d'ADNr 16S. Dans ce travail, le nombre de séquences à analyser a été limité en traitant séparément l'ADNr 16S des groupes microbiens d'abondance inégale dans le grain. Cette stratégie n'a pas requis d'étape méthodologique supplémentaire : elle a été effectuée à l'occasion de l'amplification de l'ADNr 16S du consortium qui est un préalable indispensable à toute méthode basée sur l'analyse d'une molécule génomique. Réalisée à l'aide d'amorces spécifiques pour mettre en exergue les populations minoritaires, cette stratégie est applicable à d'autres consortiums de bactéries lactiques sous condition que les populations dominantes et minoritaires concernent les mêmes groupes microbiens que ceux du grain KJ. Dans le cas contraire, elle doit être adaptée en déterminant d'autres amorces d'amplification spécifique.

L'analyse des séquences a été limitée à de courtes régions ciblées de l'ARNr 16S où sont concentrées les différences entre les espèces. Cette technique permettait une analyse visuelle des séquences plus fine que celle autorisée par les outils informatiques disponibles : la nature des nucléotides non appariés pouvait de cette façon aisément être identifiée et interprétée. Elle inscrivait par ailleurs la méthode dans les contraintes des nouveaux types d'appareils de séquençage et élargissait ainsi la perspective d'une application en routine.

Toutefois, en limitant aussi drastiquement la longueur de la séquence analysée, on perd de l'information et on diminue le pouvoir discriminant de la molécule, même en ciblant des régions contenant essentiellement de l'information utile à l'application présente.

5.2.4 *Fiabilité et limitations*

Ces courtes régions de l'ADNr 16S ont des pouvoirs discriminants variables selon le groupe microbien considéré. Les plus discriminantes vis-à-vis des bactéries lactiques de grains de kéfir ont été identifiées. Une d'elles, la région V1, autorisait une différenciation fiable des lactobacilles et des coques lactiques au niveau de l'espèce et l'identification des membres du genre *Leuconostoc*. La différenciation des *Leuconostoc* sp. a été effectuée dans une autre région de l'ADNr 16S, la région V2. Bien qu'elle était la plus discriminante vis-à-vis des leuconostocs, elle ne permet pas l'identification fiable de ces derniers au niveau de l'espèce.

La fiabilité de l'identification moléculaire repose sur l'exactitude de l'identification de la bactérie à l'origine de la séquence homologue à celle inconnue. Elle est certaine lorsqu'il s'agit de la séquence de la souche type. Dans les autres cas, la prudence impose de vérifier la source.

5.2.5 *Perspectives d'application*

Conçue pour identifier les bactéries lactiques d'un consortium susceptible d'inclure des spécimens appartenant à une large diversité d'espèces laitières, la méthode d'identification pourrait fiablement être appliquée à d'autres consortiums laitiers que les grains de kéfir. Cette méthode conviendrait, par exemple, pour caractériser les différents laits fermentés traditionnels que l'on trouve par le monde.

5.3 Avancées en matière de reconstitution d'un grain de kéfir

5.3.1 *Paramètres microbiens déterminant la formation de structures*

Les Gingerbeer plant sont des structures microbiennes apparentées aux grains de kéfir dont une constitution *in vitro*, à partir de souches isolées, a été décrite. Elles diffèrent cependant des grains de kéfir par un aspect fondamental au niveau de la formation de la structure physique : la nature de l'exopolysaccharide de la matrice des Gingerbeer plant revêt

un caractère insoluble dans l'eau tandis que celle des grains de kéfir est soluble dans l'eau. Dans le cas des grains de kéfir, le comportement de fragments du grain KJ incubés dans un substrat lacté a montré que la préservation de la structure solide en milieu aqueux est liée à une activité microbienne. La dépendance microbienne de cette propriété physique implique un schéma expérimental de constitution plus complexe que celui des Gingerbeer plant.

La simulation expérimentale des conditions naturelles de formation de grains *in situ* n'a pas conduit à la reconstitution du grain à partir de son consortium. Les descriptions des conditions naturelles prévalant lors de cette formation sont sommaires et en partie hypothétiques. Aussi, leur simulation dans une logistique de laboratoire pouvait différer de la réalité par certains points. Par la nature du substrat et les conditions d'incubation, elle en restait néanmoins vraisemblablement proche. Effectués à partir de consortiums *a priori* complets, l'absence de grains à l'issue de ces essais de simulation a montré que la présence simultanée de tous les membres du consortium ne suffit pas à la reconstitution du grain dans des conditions proches de celles à l'origine de sa formation.

Les consortiums microbiens mis en oeuvre dans ces essais de simulation comprenaient *a priori* tous les membres du consortium du grain. Il n'est toutefois pas exclu que d'autres micro-organismes aient été impliqués dans sa genèse. L'observation *in situ* de la genèse de grains de kéfir et l'analyse de l'évolution la composition microbienne des structures en formation serait un moyen de vérifier si l'amorçage de leur genèse implique des micro-organismes qui ne persistent pas dans le grain mature. La formation de grains de kéfir est toutefois un évènement lié à une pratique ancienne qui n'est peut-être plus d'application. La réalisation d'essais de reconstitution du grain KJ et de croissance de fragments du grain dans sa région d'origine, le Caucase, serait alors une alternative possible pour mettre en évidence une intervention de micro-organismes d'amorçage dans la genèse du grain KJ. Dans l'hypothèse où de tels micro-organismes sont nécessaires à la genèse du grain KJ, c'est en effet dans l'environnement microbien de sa région d'origine qu'on a le plus de chance de les trouver.

Des consortiums microbiens de compositions qualitatives identiques montraient des aptitudes différentes à former des structures microbiennes dans du lait. Extraits de grains dont la composition quantitative était variable, ces aptitudes variables à former des structures sont probablement liées à la balance des micro-organismes en présence. La formation de ces

structures était associée à une activité neutralisante vis-à-vis du substrat qui traduisait vraisemblablement un développement intense de la levure du consortium. Un autre paramètre microbien semblait déterminant dans la formation de ces structures : la présence d'un facteur connu pour stimuler la production de kéfirane, l'exopolysaccharide constitutif de la matrice des grains. Parallèlement, un consortium reconstitué avec des souches pour lesquelles cette production avait été induite en préculture formait des structures en l'absence de ce facteur. L'incidence de ce conditionnement cellulaire, et de l'état d'activité biosynthétique des producteurs de kéfirane, sur la formation de structures doit toutefois être confirmée. Dans l'affirmative, cela signifie que la formation de structures microbiennes est conditionnée par la balance microbienne et par l'état d'activité biosynthétique du (ou des) producteur(s) de kéfirane.

5.3.2 *Hypothèse de formation de grains par l'intermédiaire de biofilms*

Les structures microbiennes formées dans le lait par le consortium microbien du grain de kéfir avaient l'aspect de biofilms souples et élastiques. La formation de telles structures dans le contexte du kéfir n'est pas décrite mais les éléments de la littérature en expriment indirectement la possibilité. Par ailleurs, le lait, nature ou modifié, était inapproprié à la croissance de petites structures de grain KJ, rendant peu probable un processus de formation du grain par croissance de petites structures initiales de grain dans du lait de vache. Pour autant que le consortium du grain KJ renferme tous les micro-organismes nécessaires à sa formation, un tel processus au sein des biofilms ou l'évolution de ces biofilms vers une structure de grain de consistance plus ferme est par contre envisageable mais reste à démontrer.

Cette perspective expérimentale peut s'envisager en incubant les biofilms formés par le consortium dans des conditions favorables à la constitution de la matrice du grain, c'est à dire à la production et à la gélification du kéfirane. L'observation du comportement du grain morcelé a, indirectement, permis de les identifier : il s'agit d'une incubation en anaérobiose dans du lait additionné de glucose ou d'éthanol.

5.3.3 Rôle des différents micro-organismes dans la formation des grains

La compréhension du rôle des différents intervenants microbiens et de leur(s) mécanisme(s) d'action dans la formation des grains de kéfir est un vaste domaine qui reste largement à explorer.

La possibilité de pouvoir créer une structure microbienne *in vitro* élargit les perspectives d'investigation pour étudier son processus de formation. Elle permet notamment de statuer directement et formellement sur l'implication d'un facteur microbien ou chimique dans celle-ci. Ce travail ouvre de telles perspectives pour la formation des biofilms de kéfir. Bien que différentes des grains de kéfir, ces structures microbiennes émanent du comportement d'agrégation propre au consortium du grain et offrent un support à la compréhension des mécanismes sous-jacents.

Ce travail laisse par ailleurs entrevoir la possibilité de réduire le nombre d'intervenants microbiens à manipuler pour étudier le processus de formation des biofilms. La croissance, l'activité biosynthétique et l'aptitude à s'agglutiner variables des différents protagonistes laissent en effet penser que leur degré d'implication dans la formation des biofilms est inégal. Complétées par des informations bibliographiques, les observations relevées suggèrent un rôle déterminant de la levure du consortium, *Kazachstania exigua*, et de *Lactobacillus kefir* et un rôle de moindre importance des taxons *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Leuconostocs mesenteroides* et *Lactococcus lactis* dans la formation de ces biofilms. Disposant de souches individuelles isolées du grain capables de former ces biofilms, la vérification de cette présomption peut s'envisager par l'observation du comportement d'un consortium partiellement reconstitué, dans lequel les espèces pressenties comme étant de moindre importance feraient défaut.

Une ambiguïté concernant un aspect de la formation du grain, intervenant probablement à un stade ultérieur de sa reconstitution, a été soulevée. La caractérisation du consortium a en effet révélé la présence dans le grain KJ de deux micro-organismes susceptibles d'intervenir dans la constitution de la matrice du grain : *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* et *Lb. kefir*. Leur rôle dans cet aspect de la formation du grain pourrait être précisé en comparant la nature des exopolysaccharides produits par ces micro-organismes avec celle de l'exopolysaccharide présent dans le grain.

ANNEXE I : ANCIENNES DÉNOMINATIONS DES MICRO-ORGANISMES DU KÉFIR

| Taxons actuels (2007) | Anciennes dénominations | Références des citations |
|---|---|--|
| <u>Bactéries lactiques</u> | | |
| <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> | Takizawa <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> | <i>Lactobacillus kefirgranum</i> | Takizawa <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> | <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i> | Angulo <i>et al.</i> , 1993 Simova <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> | <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>tolerans</i> | Angulo <i>et al.</i> , 1993 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> | Angulo <i>et al.</i> , 1993 |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>Streptococcus lactis</i> | Ottogalli <i>et al.</i> , 1973 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> | Angulo <i>et al.</i> , 1993 |
| <i>Weissella viridescens</i> | <i>Lactobacillus viridescens</i> | Angulo <i>et al.</i> , 1993 |
| <u>Bactéries acétiques</u> | | |
| <i>Acetobacter pasteurianus</i> | <i>Acetobacter rancens</i> | Ottogalli <i>et al.</i> , 1973 |
| <u>Levures</u> | | |
| <i>Kazachstania exigua</i> | <i>Candida holmii</i> | Angulo <i>et al.</i> , 1993 Witthuhn <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | <i>Saccharomyces lactis</i> | Ottogalli <i>et al.</i> , 1973 |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Candida kefir</i> | Ottogalli <i>et al.</i> , 1973 Angulo <i>et al.</i> , 1993 Witthuhn <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>Saccharomyce Carlbergensis</i> | Ottogalli <i>et al.</i> , 1973 |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | <i>Candida lipolytica</i> | Witthuhn <i>et al.</i> , 2004 |

**ANNEXE II : CODE DES ACIDES NUCLÉIQUES DE L'UNION INTERNATIONALE DE
BIOCHIMIE (CORNISH-BOWDEN, 1985).**

| Code | Description |
|------|--|
| A | Adenine |
| C | Cytosine |
| G | Guanine |
| T | Thymine |
| U | Uracile |
| R | Purine (A ou G) |
| Y | Pyrimidine (C, T, ou U) |
| M | C ou A |
| K | T, U, ou G |
| W | T, U, ou A |
| S | C ou G |
| B | C, T, U, ou G (pas A) |
| D | A, T, U, ou G (pas C) |
| H | A, T, U, ou C (pas G) |
| V | A, C, ou G (pas T, pas U) |
| N | N'importe quelle base (A, C, G, T, ou U) |

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham A.G. & De Antoni G.L. (1999). Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk. *J. Dairy Res.* **66**, 327-333
- Achtman M. & Wagner M. (2008). Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat. Rev. Microbiol.* (In press).
- Alais C. (1974). Les fromages. Les enzymes coagulants. Les méthodes modernes. In Alais C., ed. *Science du lait : principes des techniques laitières*. Paris : SEP, p. 583-712
- Alonso L., Cuesta E.P. & Gilliland S.E. (2003). Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *J. Dairy Sci.* **86**, 1941-1946
- Altermann E., Russell W.M., Azcarate-Peril M.A., Barrangou R., Buck B.L., McAuliffe O., Souther N., Dobson A., Duong T., Callanan M., Lick S., Hamrick A., Cano R. & Klaenhammer T.R. (2005). Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 3906-3912
- Amiel C., Mariey L., Curk-Daubié M.C., Pichon P. & Travert J. (2000). Potentiality of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) for discrimination and identification of dairy lactic acid bacteria. *Lait* **80**, 445-459
- Angulo L., Lopez E. & Lema C. (1993). Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain). *J. Dairy Res.* **60**, 263-267
- Anonyme AFSCA (2004). Avis 28-2004 - Risques liés à *Enterobacter sakazakii*. [en ligne]. Accessible sur Internet : <http://www.afsca.be/home/com-sci/doc/avis04/Avis_2004-28.pdf>, consulté le 21 juin 2007.
- Anonyme Centre belge d'information pharmacothérapeutique (2008). Répertoire commenté des médicaments, septembre 2008. [en ligne]. Accessible sur Internet : <<http://www.cbip.be>>, consulté le 08 septembre 2008.
- Anonyme Centre for Infections (2007). Identification of glucose non-fermenting Gram negative rods. [en ligne]. Accessible sur Internet : <<http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/bsopid/pdf/bsopid17.pdf>>, consulté le 21 juin 2007.
- Anonyme DSMZ (2001). Acetobacter Peroxydans Medium: Medium 254. Braunschweig, Allemagne : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.
- Anonyme FDA (1999). Factors affecting the growth of some foodborne pathogens. In *The "Bad Bug Book"*. Rockville, MD, USA : U.S. Food & Drug Administration. [en ligne]. Accessible sur Internet : <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/factors.html>>, consulté le 4 juin 2007.
- Anonyme Groupe Danone (2006). Actualités. [en ligne]. Accessible sur Internet : <<http://www.danone.com/wps/portal/jump/DanoneCorporate.Presse.Actualites.Communications?ref=CMS.DanoneCorporate.Presse.Actualites.Communications.Trimestre3.070906>>, consulté le 25 mai 2007.
- Anonyme Groupe Danone (2007). Marques et Produits. [en ligne]. Accessible sur Internet : <<http://www.danone.com/wps/portal/jump/DanoneCorporate.Marques.ProdLaitiers>>, consulté le 23 mai 2007.
- Anonyme European Food Safety Authority (2005). Zoonoses in the European Union. [en ligne]. Accessible sur Internet : <http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/publications.Par.0011.File.dat/efsa_zoonoses_2005_brochure_en.pdf>, consulté le 8 juin 2007.
- Anonyme FAO/WHO (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 1-4 October 2001. [en ligne]. Accessible sur Internet : <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf>, consulté le 28 novembre 2007.

- Anonyme INRA (2008). Flore d'affinage des fromages. [en ligne]. Accessible sur Internet : <<http://www.inra.fr/internet/Directions/DIC/presinra/SAQfiches/floreaffin.htm>>, consulté le 11 avril 2008.
- Anonyme Lifeway (2005). How cultured are you? [en ligne]. Accessible sur Internet : <www.lifeway.net/about.php>, consulté le 24 mai 2007.
- Anonyme RDP (2008). Ribosomal Database Project II. [en ligne]. Accessible sur Internet : <<http://rdp.cme.msu.edu>>, consulté le 02 juin 2008.
- Anonyme Valio (2007). SIA Valio International, Latvia. [en ligne]. Accessible sur Internet : <http://www.valio.fi/portal/page/portal/valio.com/Valio_worldwide/Subsidiaries/sia_valio_international_04082006150235>, consulté le 25 mai 2007.
- Arihara K., Toba T. & Adachi S. (1990). Immunofluorescence microscopic studies on distribution of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus kefir* in kefir grains. *Int. J. Food Microbiol.* **11**, 127-134
- Assadi M.M., Pourahmad R. & Moazami N. (2000). Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 541-543
- Athanasiadis I., Boskou D., Kanellaki M. & Koutinas A.A. (2001). Effect of carbohydrate substrate on fermentation by kefir yeast supported on delignified cellulosic materials. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 658-663
- Athanasiadis I., Boskou D., Kanellaki M., Kiosseoglou V. & Koutinas A.A. (2002). Whey liquid waste of the dairy industry as raw material for potable alcohol production by kefir granules. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7231-7234
- Barnett J.A., Payne R.W. & Yarrow D. (2000). *Saccharomyces exiguus* Reess 1870. In Barnett J.A., Payne R.W. & Yarrow D., eds. *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge, UK : Cambridge University Press, p. 646
- Bergmaier D. (2002). Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lb. rhamnosus* RW-9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum. [en ligne]. Accessible sur Internet : <<http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/files/ff2434b9-5952-4866-b23a-2bf6ba292499/20383.html>>, consulté le 06 décembre 2007.
- Bhowmik T. & Marth E. (1990). Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. *J. Dairy Sci.* **73**, 859-866
- Bottazzi V. & Bianchi F. (1980). A note on scanning electron microscopy of micro-organisms associated with the kefir granule. *J. Appl. Bacteriol.* **48**, 265-268
- Brenner D.J., Fanning G.R., Rake A.V. & Johnson K.E. (1969). Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Anal. Biochem.* **28**, 447-459
- Brenner D.J., Staley J.T. & Krieg N.R. (2005). Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. In Brenner D.J., Staley J.T. & Krieg N.R., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. New York, USA : Springer, p. 27-32
- Bringel F., Castioni A., Olukoya D.K., Felis G.E., Torriani S. & Dellaglio F. (2005). *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1629-1634
- Browne N. & Dowds B.C.A. (2002). Acid stress in food pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 404-414
- Cai H., Rodríguez B.T., Zhang W., Broadbent J.R. & Steele J.L. (2007). Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiol.* **153**, 2655-2665
- Cammarota M.C. & Sant'Anna G.L. (1998). Metabolic blocking of exopolysaccharides synthesis: effects on microbial adhesion and biofilm accumulation. *Biotechnol. Lett.* **20**, 1-4
- Cerning J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 113-130

- Chagnaud P., Machinis K., Coutte L.A., Marecat A. & Mercenier A. (2001). Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Meth.* **44**, 139-148
- Cheirsilp B., Shimizu H. & Shioya S. (2003a). Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* **100**, 43-53
- Cheirsilp B., Shoji H., Shimizu H. & Shioya S. (2003b). Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for kefir production. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 279-284
- Chen C. & Liu B.Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 834-839
- Chen M.J., Liu J.R., Sheu J.F., Lin C.W. & Chuang C.L. (2006). Study on skin care properties of milk kefir whey. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **19**, 905-908
- Chen C., Chan H.M. & Kubow S. (2007). Kefir extracts suppress in vitro proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells but not normal mammary epithelial cells. *J. Med. Food* **10**, 416-422
- Chen H.C., Wang S.Y. & Chen M.J. (2008). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiol.* **25**, 492-501
- Choi I.K., Jung S.H., Kim B.J., Park S.Y., Kim J. & Han H.U. (2003). Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of kimchi, a fermented cabbage product. *Antonie Van Leeuwenhoek* **84**, 247-253
- Christensen H., Angen O., Mutters R., Olsen J.E. & Bisgaard M. (2000). DNA-DNA hybridization determined in micro-wells using covalent attachment of DNA. *Int. J. Syst.* **50**, 1095-1102
- Clarke L.A., Rebelo C.S., Gonçalves J., Boarida M.G. & Jordan P. (2001). PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *J Clin Pathol* **54**, 351-353
- Cilia V., Lafay B. & Christen R. (1996). Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 451-461
- Couret V., Dubernet S., Bernardeau M., Gueguen M. & Vernoux J.P. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait* **83**, 269-306
- Cohan F.M. & Perry E.B. (2007). A systematic for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Curr. Biol.* **17**, R373-R386
- Collins M.D., Rodrigues U., Ash C., Aguirre M., Farrow J.A.E., Martinez-Murcia A., Phillips B.A., Williams A.M. & Wallbanks S. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**, 5-12
- Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J. & Wallbanks S. (1993). Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausage: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 595-603
- Compère C. (1999). Biofilms en milieu marin. *Tec. Sci. Méthodes* **11**, 48-54
- Cornish-Bowden A. (1985). Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. *Nucl. Acids Res.* **13**, 3021-3030
- Costerton J.W. & Lewandowski Z. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 711-745
- Crosa J.H., Brenner D.J. & Falkow S. (1973). Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes. *J. Bacteriol.* **115**, 904-911
- Curk M.C., Boeufgras J.M., Decaris B., Gavini F., Kersters K., Larpent J.P., Le Bourgeois P., Renault P., de Roissart H. & Rouvier C. (1994a). Méthodes d'identification des bactéries lactiques. In de Roissart H. & Luquet F.M., eds. *Bactéries lactiques I*. Uriage, France : Lorica, p. 141-168
- Curk M.C., Peladan F., Hubert J.C. (1994b). Fourier transform infrared spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**, 241-248
- Cusick S.M. & O'Sullivan D.J. (2000). Use of a single, triplicate arbitrarily primed-PCR procedure for molecular fingerprinting of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2227-2231

- De Ley J., Cattoir H. & Reynaerts A. (1970). The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* **12**, 133-142
- De Ley J., Gillis M. & Swings J. (1984). Family VI. *Acetobacteraceae* Gillis and De Ley 1980. In Krieg N.R. & Holt J.G., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Baltimore, USA : William & Wilkins, p. 267-278
- Delfederico L., Hollmann A., Martinez M., Iglesias G., De Antoni G. & Semorile L. (2006). Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. *J. Dairy Res.* **73**, 20-27
- Dellaglio F., de Roissart H., Torriani S., Curk M.C. & Janssens D. (1994). Taxonomie, métabolisme, croissance et génétique des bactéries lactiques. In de Roissart H. & Luquet F.M., eds. *Bactéries lactiques I*. Uriage, France : Loriga, p. 23-116
- Denis C., Gueguen M., Henry E. & Levert D. (2001). New media for the numeration of cheese surface bacteria. *Lait* **81**, 365-379
- Desmazeaud M. (1992). Les germes utiles. In Hermier J., Lenoir J. & Weber F., eds. *Les groupes microbiens d'intérêt laitier*. Paris : Cepil, p. 9-60
- Desmazeaud M.J. (1994). Le lait milieu de culture. In de Roissart H. & Luquet F.M., eds. *Bactéries lactiques II*. Uriage, France : Loriga, p. 25-36
- De Urza P.J., Gomez-Zavaglia A., Lozano M.E., Romanowski V. & De Antoni G.L. (2000). DNA fingerprinting of thermophilic lactic acid bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *J. Dairy Res.* **67**, 381-392
- De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem F. & Degeest B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **11**, 687-707
- Diggle S.P., Gardner A., West S.A. & Griffin A.S. (2007). Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **362**, 1241-1249
- Dimitrellou D., Kourkoutas Y., Banat I.M., Marchant R. & Koutinas A.A. (2007). Whey-cheese production using freeze-dried kefir cultures as a starter. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 1170-1183
- Dingding A., Danhorn T., Fuqua C. & Parsek M.R. (2006). Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *PNAS* **103**, 3828-3833
- Dobson C.M., Chaban B., Deneer H. & Ziola B. (2004). *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Lactobacillus zeae* isolates identified by sequence signature and immunoblot phenotype. *Can. J. Microbiol.* **50**, 482-488
- Duboc P. & Mollet B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int. Dairy J.* **11**, 759-768
- Duitschaever C.L., Kemp N. & Smith A.K. (1988). Microscopic studies of the microflora of kefir grains and of kefir made by different methods. *Milchwiss.* **43** (8), 479-481
- Dziuba B., Babuchowski A., Nałęcz D. & Niklewicz M. (2007). Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. *Int. Dairy J.* **17**, 183-189
- Elliot J. (1984). Genus *Acinetobacter* Brisou and Prévot 1954. In Krieg N.R. & Holt J.G., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Baltimore, USA : William & Wilkins, p. 303-307
- Ercolini D., Hill P.J. & Dodd C.E.R. (2003). Bacterial community structure and location in Silton cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3540-3548
- Esteller M.S., Zancanaro O., Palmeira C.N.S. & da Silva Lannes S.C. (2006). The effect of kefir addition on microstructure parameters and physical properties of porous white bread. *Eur. Food Res. Technol.* **222**, 26-31
- Euzéby J.P. (2004). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. [en ligne]. Accessible sur Internet : <<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ww/weissella.html>>, consulté le 9 décembre 2007.
- Evans J.B. & Niven C.F. (1951). Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. *J. Bacteriol.* **62**, 599-603

- Ezaki T., Hashimoto Y. & Yabuuchi E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 224-229
- Farber J.M., Sanders G.W., Dunfield S. & Prescott R. (1989). The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **9**, 181-193
- Farnworth E.R. (1999). Kefir : from folklore to regulatory approval. *J. Nutraceuticals Funct. Med. Foods.* **1**, 57-68
- Fasoli S., Marzotto M., Rizzotti L., Rossi F., Dellaglio F. & Torriani S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **82**, 59-70
- Filipev B., Simurina O. & Bodroza-Solarov M. (2007). Effect of native and lyophilized kefir grains on sensory and physical attributes of wheat bread. *J. Food Process. Preserv.* **31**, 367-377
- Filloux A. & Vallet I. (2003). Biofilms : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Med. Sci.* **19**, 77-83
- Florez A.B., Lopez-Diaz T.M., Alvarez-Martin P. & Mayo B. (2006). Microbial characterization of the traditional Spanish blue-veined Cabrales cheese: identification of dominant lactic acid bacteria. *Eur. Food Res. Technol.* **223**, 503-508
- Florez A.B. & Mayo B. (2006). Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *Int. J. Food Microbiol.* **110**, 165-171
- Fox G.E, Wisotzkey J.D. & Jurtshuk P. (1992). How is close : 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 166-170
- Fujisawa T., Adachi S., Toba T., Arihara K & Mitsuoka T. (1988). *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. isolated from kefir grains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 12-14
- Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378
- Gagnaire V., Thierry A. & Léonil J. (2001). Propionibacteria and facultatively heterofermentative lactobacilli weakly contribute to secondary proteolysis of Emmental cheese. *Lait* **81**, 339-353
- Gahan C.G., O'Driscoll B. & Hill C. (1996). Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3128-3132
- Garbers I.M., Britz T.J. & Witthuhn R.C. (2004). PCR-based denaturing gradient gel electrophoretic typification and identification of the microbial consortium present in kefir grains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 687-693
- Garrote G.L., Abraham A. G. & De Antoni G. L. (1997). Preservation of kefir grains, a comparative study. *Lebensm. Wiss. Technol.* **30**, 77-84
- Garrote G.L., Abraham A. G. & De Antoni G. L. (1998). Characteristics of kefir prepared with different grain:milk ratios. *J. Dairy Res.* **65**, 149-154
- Garrote G.L., Abraham A. G. & De Antoni G. L. (2000). Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *J. Food Prot.* **63**, 364-369
- Garrote G.L., Abraham A. G. & De Antoni G. L. (2001). Chemical and microbial characterisation of kefir grains. *J. Dairy Res.* **68**, 639-652
- Garvie E.I. (1984). Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. *Methods Microbiol.* **16**, 147-178
- Garvie E.I. (1986). Genus *Pediococcus* Claussen 1903. In Sneath P.H.A., ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. Baltimore, USA : William & Wilkins, p. 1075-1082
- Germond J.-E., Lapiere L., Delley M., Mollet B., Felis G.E. & Dellaglio F. (2003). Evolution of the bacterial species *Lactobacillus delbrueckii*: a partial genomic study with reflections on prokaryotic species concept. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 93-104

- Gibson T. & Abdel-Malek Y. (1945). The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *J. Dairy Res.* **14**, 35-44
- Gillis M., Vandamme P., De Vos P., Swings J. & Kersters K. (2005). Polyphasic taxonomy. In Brenner D.J., Staley J.T. & Krieg N.R., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. New York, USA : Springer, p. 43-48
- Giraffa G., Lazzi C., Gatti M., Rossetti L., Mora D. & Neviani E. (2003). Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. *Int. J. Food Microbiol.* **82**, 163-172
- Golowczyc M.A., Mobili P., Garrote G.L., Abraham A.G. & De Antoni G.L. (2007). Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteridis. *Int. J. Food Microbiol.* **118**, 264-273
- Golowczyc M.A., Gugliada M.J., Hollmann A., Delfederico L., Garrote G.L., Abraham A.G., Semorile L. & De Antoni G. (2008). Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. *J. Dairy Res.* **75**, 211-217
- Goris J., Suzuki K.I., De Vos P., Nakase T. & Kersters K. (1998). Evaluation of a microplate DNA:DNA hybridization method compared with the initial renaturation method. *Can. J. Microbiol.* **44**, 1148-1153
- Grimont P.A.D., Popoff M.Y., Grimont F., Coynault C. & Lemelin M. (1980). Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. *Curr. Microbiol.* **4**, 325-330
- Gueguen M. & Schmidt J.L. (1992). Les levures et *Geotrichum candidum*. In Hermier J., Lenoir J. & Weber F., eds. *Les groupes microbiens d'intérêt laitier*. Paris : Cepil, p.165-220
- Gulmez M. & Guven A. (2003). Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in different yogurt and kefir combinations as prefermentation contaminant. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 631-636
- Güven A., Güven A. & Gülmez M. (2003). The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *J. Vet. Med.* **50**, 412-416
- Guzel-Seydim Z.B., Wyffels J.T., Seydim A.C. & Greene A.K. (2005). Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. *Int. J. Dairy Technol.* **58**, 25-29
- Guzel-Seydim Z.B., Seydim A.C., Greene A.K. & Tas T. (2006). Determination of antimutagenic properties of acetone extracted fermented milks and changes in their total fatty acid profiles including conjugated linoleic acids. *Int. J. Dairy Technol.* **59**, 209-215
- Hallé C., Leroi F., Dousset X. & Pidoux M. (1994). Les kéfirs : des associations bactéries/levures. In de Roissart H. & Luquet F.M., eds. *Bactéries lactiques II*. Uriage, France : Lorica, p. 169-182
- Hammes W.P. & Vogel R.F. (1995). The genus *Lactobacillus*. In Wood B.J.J. & Holzapfel W.H., eds. *The genera of lactic acid bacteria*. Glasgow, UK : Blackie academic & professional, p. 19-54
- Hardie J.M. (1986). Genus *Streptococcus* Rosenbach 1884. In Sneath P.H.A., ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. Baltimore, USA : William & Wilkins, p. 1043-1071
- Hemme D. & Foucaud-Scheunemann C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int. Dairy J.* **14**, 467-494
- Hentzer M., Givskov M. & Eberl L. (2004). Quorum sensing in biofilms: gossip in slime city. In Ghannoum M. & O'Toole G., eds. *Microbial biofilms*. Washington, DC : ASM Press, p. 118-140
- Hertzler S.R. & Clancy S.M. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *J. Am. Diet. Assoc.* **130**, 582-587
- Huys G., Vancanneyt M., D'Haene K., Vankerhoven V., Goossens H. & Swings J. (2006). Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res. Microbiol.* **157**, 803-810
- Imberechts H., Vanholme L. & Dierick K. (2004). Trends and sources – Report on zoonotic agents in Belgium in 2004. [en ligne]. Accessible sur Internet : <http://www.afsca.be/home/pub/doc/autre/Report_TS_%202004_S.pdf>, consulté le 8 juin 2007.
- Jamotte P. (1974). Note technique sur le kéfir. Gembloux, Belgique : Station laitière de l'Etat.

- Jiang J., Björck L. & Fondén R. (1998). Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 95-102
- Jouve J.L. (1996). Produits laitiers frais. In Jouve J.L., ed. *La qualité microbiologique des aliments : maîtrise et critères*. Paris : Polytechnica, p. 411-420.
- Kabayama S., Osada K., Tachibana H., Katakura Y. & Shirahata S. (1997). Enhancing effects of food components on the production of interferon β from animal cells suppressed by stress hormones. *Cytotechnology* **23**, 119-125
- Kandler O. & Kunath P. (1983). *Lactobacillus kefir* sp. nov., a component of the microflora of kefir. *System. Appl. Microbiol.* **4**, 286-294
- Kandler O. & Weiss N. (1986). Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901. In Sneath P.H.A., ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. Baltimore, USA : William & Wilkins, p. 1209-1239
- Kao Y.T., Liu Y.S. & Shyu Y.T. (2007). Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Res. Int.* **40**, 71-79
- Khanal R.C. (2004). Potential health benefits of conjugated linoleic acid (CLA): a review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **17**, 1315-1328
- Klijjn N., Weerkamp A.H. & De Vos W. (1991). Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3390-3393
- Koeppel A., Perry E.B., Sikorski J., Krizanc D., Warner A., Ward D.M., Rooney A.P., Brambilla E., Connor N., Ratcliff R.M., Nevo E. & Cohan F.M. (2008). Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *PNAS* **19**, 2504-2509
- Kocur M. (1986). Genus I. *Micrococcus* Cohn 1872. In Sneath P.H.A., ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. Baltimore, USA : William & Wilkins, p. 1004-1010
- Kojima S., Takizawa S., Tamura S., Funjinaga S., Benno Y. & Nakase T. (1993). An improved medium for the isolation of lactobacilli from kefir grains. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 119-120
- Kooiman P. (1968). The chemical structure of kefiran, the water soluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohydr. Res.* **7**, 200-211
- Koroleva N.S. (1988). Technology of kefir and kumys. *Bull. Int. Dairy Fed.* **227**, 96
- Kosikowski F.V. (1982). Fermented milks. In Kosikowski F.V. & Assoc., eds. *Cheese and fermented milk foods*. New York, USA : Brooktondale, p. 37-48
- Koutinas A.A., Athanasiadis I., Bekatorou A., Psarianos C., Kanellaki M., Agouridis N. & Blekas G. (2007). Kefir-yeast technology: Industrial scale-up of alcoholic fermentation of whey, promoted by raisin extracts, using kefir-yeast granular biomass. *Enzyme Microb. Technol.* **41**, 576-582
- Krieg N.R. (2005). Identification of procaryotes. In Brenner D.J., Staley J.T. & Krieg N.R., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. New York, USA : Springer, p. 33-38
- Krooneman J., Faber F., Alderkamp A.C., Oude Elferink S.J.H.W., Driehuis F., Cleenwerck I., Swings J., Gottschal J.C. & Vancanneyt M. (2002). *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 639-646
- Kullen M.J., Sanozky-Dawes R.B., Crowell D.C. & Klaenhammer T.R. (2000). Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 511-516
- Kuo C.Y. & Lin C.W. (1999). Taiwanese kefir grains: their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. *Aust. J. Dairy Technol.* **54**, 19-23
- Kurtzman C.P. (2003). Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorasporula*. *FEMS Yeast Res.* **4**, 233-245
- Kwon Y.I., Apostolidis E. & Shetty K. (2006). Anti-diabetes functionality of kefir culture-mediated fermented soymilk supplemented with *Rhodolia* extracts. *Food Biotechnol.* **20**, 13-29

- Lacrosse R. (1970). Le kéfir, lait fermenté diététique. *Rev. Agric.* **10**, 1485-1489
- Lacrosse R. (1981). Le kéfir, boisson lactée fermentée. *Lait Nous* **4**, 7-9
- la Rivière J.W.M. & Kooiman P. (1967). Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch. Mikrobiol.* **59**, 269-278
- Lasa I. (2006). Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int. Microbiol.* **9**, 21-28
- Laws A.P. & Marshall V.M. (2001). The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **11**, 709-721
- Lee I.S., Slonczewski J.L. & Foster J.W. (1994). A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**, 1422-1426
- Lee M.Y., Ahn K.S., Kwon O.K., Kim M.J., Kim M.K., Lee I.Y., Oh S.R. & Lee H.K. (2007). Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. *Immunobiology* **212**, 647-654
- Leisner J.J., Pot B., Christensen H., Rusul G., Olsen J.E., Wee B.W., Muhamad K. & Ghazali H.M. (1999). Identification of lactic acid bacteria from chili bo, a Malaysian food ingredient. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 599-605
- Libudzisz Z. & Piatkiewicz A. (1990). Kefir production in Poland. *Dairy Ind. Int.* **55**, 31-33
- Lilly D.M. & Stillwell R.H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* **147**, 747-748
- Lin C.W., Chen H.L. & Liu J.R. (1999a). Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. *Aust. J. Dairy Technol.* **54** (1), 14-18
- Lin T.Y., Lin C.W. & Lee C.H. (1999b). Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chem.* **67**, 1-5
- Lindsay R.C. & Day E.A. (1965). Rapid quantitative method for determination of acetaldehyde in lactic starter cultures. *J. Dairy Sci.* **48**, 665-669
- Liu J.R., Chen M.J. & Lin C.W. (2002a). Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. *J. Food Sc.* **67**, 104-108
- Liu J.R., Wang S.Y., Lin Y.Y. & Lin C.W. (2002b). Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutr. Cancer* **44**, 182-187
- Liu J.R., Wang S.Y., Chen M.J., Yueh P.Y. & Lin C.W. (2006a). The anti-allergenic properties of milk kefir and soymilk kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora. *J. Sci. Food Agric.* **86**, 2527-2533
- Liu J.R., Wang S.Y., Chen M.J., Chen H.L., Yueh P.Y. & Lin C.W. (2006b). Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soymilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *Br. J. Nutr.* **95**, 939-946
- Loones A. (1994). Laits fermentés par les bactéries lactiques. In de Roissart H. & Luquet F.M., eds. *Bactéries lactiques II*. Uriage, France : Lorica, p. 135-154
- Mainville I., Robert N., Lee B., Farnworth E.R. (2006). Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 59-68
- Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V., Polouchine N., Shakhova V., Grigoriev I., Lou Y., Rohksar D., Lucas S., Huang K., Goldstein D.M., Hawkins T., Plengvidhya V., Welker D., Hughes J., Goh Y., Benson A., Baldwin K., Lee J.-H., Diaz-Muniz I., Dosti B., Smeianov V., Wechter W., Barabote R., Lorca G., Altermann E., Barrangou R., Ganesan B., Xie Y., Rawsthorne H., Tamir D., Parker C., Breidt F., Broadbent J., Hutkins R., O'Sullivan D., Steele J., Unlu G., Saier M., Klaenhammer T., Richardson P., Kozyavkin S., Weimer B. & Mills D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 15611-15616
- Marshall V.M. & Cole W.M. (1984). Studies on kefir. *Bull. Int. Dairy Fed.* **179**, XIII
- Masco L., Huys G., Gevers D., Verbruggen L. & Swings J. (2003). Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 557-563

- Matsuo M., Shichijo K., Okaichi K., Wen C.Y., Fukuda E., Nakashima M., Nakayama T., Shirahata S., Tokumaru S. & Sekine I. (2003). The protective effect of fermented milk kefir on radiation-induced apoptosis in colonic crypt cells of rats. *J. Radiat. Res.* **44**, 111-115
- Mc Donald L.C., Flemming H.P. & Hanssen H.M. (1990). Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2120-2124
- Mehlen A., Goeldner M., Ried S., Stindl S., Ludwig W. & Schleifer K.H. (2004). Development of a fast DNA-DNA hybridization method based on melting profiles in microplates. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**, 689-695
- Miyamoto M., Nakajima H., Muigai C.W., Kiiyukia C. & Miyamoto T. (2005). Identification of lactic acid bacteria isolated from kenyan traditional fermented milk, Maziwa lala, and their symbiotic relationship. *Milchwiss.-Milk Sci. Int.* **60**, 416-418
- Molska I., Kocoń J. & Zmarlicki S. (1980). Electron microscopic studies on structure and microflora of kefir grains. *Acta Alim. Pol.* **VI**, 145-154
- Monnet V. & Gripon J.C. (1994). Métabolisme azoté des bactéries lactiques. In de Roissart H. & Luquet F.M., eds. *Bactéries lactiques I*. Uriage, France : Loriga, p. 331-347
- Monsan P., Bozonnet S., Albenne C., Joucla G., Willemot R.M. & Remaud-Siméon M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **11**, 675-685
- Mori K., Yamazaki K., Ishiyama T., Katsumata M., Kobayashi K., Kawai Y., Inoue N. & Shinano H. (1997). Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 54-57
- Mori S., Mori K., Suzuki I. & Kasumi T. (2004). Phylogenetic analysis of *Lactococcus lactis* subspecies based on decoding the sequence of the pepT tripeptidase gene, the pepV dipeptidase gene and 16S rRNA. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**, 414-422
- Mounier J., Gelsomino R., Goerges S., Vancanneyt M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Scherer S., Swings J., Fitzgerald G.F. & Cogan T.M. (2005). Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6489-6500
- Muir D.D., Tamine A.Y. & Wszolek M. (1999). Comparison of the sensory profiles of kefir, buttermilk and yogurt. *Int. J. Dairy Technol.* **52**, 129-134
- Mukai T., Watanabe N., Toba T., Itoh T. & Adachi S. (1991). Gel-forming characteristics and rheological properties of kefir. *J. Food Sci.* **56**, 1017-1026
- Murofushi M., Shiomi M. & Aibara K. (1983). Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. *Japan J. Med. Sci. Biol.* **36**, 49-53
- Nagira T., Narisawa J., Teruya K., Katakura Y., Shim S.Y., Kusumoto K., Tokumaru S., Tokumaru K., Barnes D.W. & Shirahata S. (2002). Suppression of UVC-induced cell damage and enhancement of DNA repair by the fermented milk, kefir. *Cytotechnology* **40**, 125-137
- Naumann D., Fijala V., Labischinski H. & Giesbrecht P. (1988). The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier transform infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis. *J. Mol. Struct.* **74**, 165-170
- Neefs J.M., Van de Peer Y., De Rijk P., Chapelle S & De Wachter R. (1993). Compilation of small ribosomal subunit RNA structure. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3025-3049
- Neve H. (1992). Analysis of kefir grain starter cultures by scanning electron microscopy. *Milchwiss.* **47**, 275-278
- Niemann S., Puehler A., Tichy H.V., Simon R. & Selbitschka W. (1997). Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *J. Appl. Microbiol.* **82**, 477-484
- Ninane V. (2002). Le kéfir : procédés de fabrication et caractérisation du consortium de micro-organismes. Mémoire de fin d'études. Gembloux, Belgique : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux.
- Ninane V., Berben G., Romnee J.M. & Oger R. (2005a). Variability of the microbial abundance of a kefir grain starter cultivated in partially controlled conditions. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **9**, 191-194

- Ninane V., Dehareng F. Oger R. & Berben G. (2005b). Conjugated linoleic acid content of kefir. In *Prospects for health, well-being and safety*, Proc. Fourth Nizo Dairy Conf., Papendal, The Netherlands, 15-17 June 2005. Oxford, UK : Elsevier.
- Ninane V., Mukandayambaje R. & Berben G. (2006). Use of 16S rRNA V1 region analysis for the identification of lactobacilli occurring in a kefir grain. In *Scientific and technological challenges in fermented milk*, Proc. Second IDF Dairy Sci. Technol. Week, Sirmione Italy 15-19 May 2006. Bruxelles : FIL-IDF.
- Ninane V., Mukandayambaje R. & Berben G. (2007). Identification of lactic acid bacteria within the consortium of a kefir grain by sequencing 16S rDNA variable regions. *J. AOAC Int.* **90**, 1111-1117
- Niven C.F. & Evans J.B. (1957). *Lactobacillus viridescens* nov. spec., a heterofermentative species that produces a green discoloration of cured meat pigments. *J. Bacteriol.* **73**: 758-759
- O'Driscoll B., Gahan C.G.M. & Hill C. (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1693-1698
- Ogier J.C., Son O., Gruss A., Tailliez P. & Delacroix-Buchet A. (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3691-3701
- Ogier J.C., Lafarge V., Girard V., Rault A., Maladen V., Gruss A., Leveau J.Y. & Delacroix-Buchet A. (2004). Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5628-5643
- Oguntoyinbo F.A. (2007). Identification and functional properties of dominant lactic acid bacteria isolated at different stages of solid state fermentation of cassava during traditional gari production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1425-1432
- Ota A. (1999). Protection against an infectious disease by enterohaemorrhagic *E. coli* O-157. *Med. Hypotheses* **53**, 87-88
- Ottogalli G., Galli A., Resmini P. & Volonterio G. (1973). Composizione microbiologica, chimica ed ultrastruttura dei granuli di kefir. *Ann. Microbiol.* **23**, 109-121
- Pariza M.W. (2004). Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 1132S-1136S
- Parker R.B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health* **29**, 4-8
- Pearson W.R. & Lipman D.J. (1988) Improved tools for biological sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 2444-2448
- Picioreanu C., Kreft J.U., Klausen M., Haagenen J.A.J., Tolker-Nielsen T. & Molin S. (2007). Microbial motility involvement in biofilm structure formation – a 3D modelling study. *Water Sci. Technol.* **55**, 337-343
- Pidoux M. (1984). Les kéfirs : kéfirs lactés et kéfirs sucrés. *Tech. Lait* **Avril**, 29-33
- Pidoux M., Brillouet J.M. & Quemener B. (1988). Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnol. Lett.* **10**, 415-420
- Pidoux M. (1989). The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant) : biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *MIRCEN J.* **5**, 223-238
- Pidoux M., Pilet M.F. & Ripoche V. (1992). Growth performances of *Lactobacillus hilgardii* immobilized in dextran gel and in continuous fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 393-398
- Piermaria J.A., de la Canal M.L. & Abraham A.G. (2008). Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids* **22**, 1520-1527
- Pintado M.E., Da Sylva L.J.A., Fernandes P.B., Malcata X. & Hogg J.A. (1996). Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. *Int. J. Food Sci. Technol.* **31**, 15-26
- Plessas S., Pherson L., Bekatorou A., Nigam P. & Koutinas A.A. (2005). Bread making using kefir grains as baker's yeast. *Food Chem.* **93**, 585-589

- Plessas S., Bekatorou A., Kanellaki M., Koutinas A.A., Marchant R. & Banat I.M. (2007a). Use of immobilized cell biocatalysts in baking. *Process Biochem.* **42**, 1244-1249
- Plessas S., Trantallidi M., Bekatorou A., Kanellaki M., Nigam P. & Koutinas A.A. (2007b). Immobilization of kefir and *Lactobacillus casei* on brewery spent grains for use in sourdough wheat bread making. *Food Chem.* **105**, 187-194
- Plessas S., Kollopoulos D., Kourkoutas Y., Psarianos C., Alexopoulos A., Marchant R., Banat I.M. & Koutinas A.A. (2008). Upgrading of discarded oranges through fermentation using kefir in food industry. *Food Chem.* **106**, 40-49
- Pot B., Vandamme P. & Kersters K. (1994). Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints. In Goodfellow M. & O'Donnell A.G., eds. *Chemical methods in prokaryotic systematics*. Chichester, U.K. : Wiley J. & sons.
- Powell J.E., Todorov S.D., Van Reenen C.A., Dicks L.M.T. & Witthuhn R.C. (2006). Growth inhibition of *Enterococcus mundtii* in kefir by in situ production of bacteriocin ST8KF. *Lait* **86**, 401-405
- Qiu Y., Wu L., Huang H., Mc Donel P.E., Palumbo A.V., Tiedje J.M. & Zhou, J. (2001) Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol* **67**, 880-887
- Quiros A., Hernandez-Ledesma B., Ramos M., Amigo L. & Recio I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *J. Dairy Sci.* **88**, 3480-3487
- Rainer L. & Heiss C.J. (2004). Conjugated linoleic acid: health implications and effects on body composition. *J. Am. Diet. Assoc.* **104**, 963-968
- Rea M.C., Lennartsson T., Dillon P., Drinan F.D., Reville W.J., Heapes M. & Cogan T.M. (1996). Irish kefir-like grains : their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *J. Appl. Bact.* **81**, 83-94
- Renard A.C. (2000). Les ingrédients santé à la conquête de l'Europe. *Rev. Lait. Fr.* **598**, 16-21
- Reynaud M.J. (1997). Kéfir de lait Yalacta. Document 301/80-6/200. Caen, France : Yalacta.
- Reysenbach A.L., Giver L.J., Wickham G.S. & Pace N.R. (1992). Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3417-3418
- Richard C. (1984). Genus *Enterobacter* Hormaeche and Edwards 1960. In Krieg N.R. & Holt J.G., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Baltimore, USA : William & Wilkins, p. 465-469
- Rimada P.S. & Abraham A.G. (2001). Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *J. Dairy Res.* **68**, 653-661
- Rochelle P.A., Fry J.C., Parkes R.J. & Weightman A.J. (1992). DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**, 59-66
- Roué M. (1996). Information scientifique et désinformation. [en ligne]. SPS 221. Accessible sur Internet : <<http://www.pseudo-sciences.org/spip.php?article149>>, consulté le 14 mars 2007.
- Rozier J., Carlier V. & Bolnot F. (1985). Classification et principales caractéristiques des micro-organismes des denrées alimentaires animales et d'origine animale. In Rozier J., Carlier V. & Bolnot F., eds. *Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments*. Paris : Ecole nationale vétérinaire de Maisons-Alfort, p. 17-28
- Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J. & Zoon P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **12**, 163-171
- Salminen, S., Bouley C., Boutron-Ruault M.-C., Cummings J.H., Franck A., Gibson G.R., Isolauri E., Moreau M.-C., Roberfroid M. & Rowland I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* **80**, S147-S171
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* **82**, 181-189
- Sánchez J.I., Martínez B. & Rodríguez A. (2005). Rational selection of *Leuconostocs* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **105**, 377-387

- Santos A., San Mauro M., Sanchez A., Torres J.M. & Marquina D. (2003). The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *System. Appl. Microbiol.* **26**, 434-437
- SAS Institute Inc. (1994). *SAS/STAT User's Guide*. Cary, NC, USA : Statistical Analysis System Institute.
- Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Bälz R., Collins M.D. & Fischer W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *System. Appl. Microbiol.* **6**, 183-195
- Schleifer K.H., Ehrmann M., Beimfohr C., Brockmann E., Ludwig W. & Amann R. (1995). Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **5**, 1081-1084
- Shiomi M., Sasaki K., Murofushi M. & Aibara K. (1982). Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Japan J. Med. Sci. Biol.* **35**, 75-80
- Shinohara K. (1995). Functional foods for specific health use - The needs for compositional data. In Greenfield H., ed. *Quality and accessibility of food related data*. Proc. First Int. Food Data Base Conf., Australia, 22-24 September 1993. Arlington, VA, USA : AOAC International, p. 305-310
- Simova E., Beshkova D., Angelov A., Hristozova Ts., Frengova G. & Spasov Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 1-6
- Simpson P.J., Fitzgerald G.F., Stanton C. & Ross R.P. (2006). Enumeration and identification of pediococci in powder-based products using selective media and rapid PFGE. *J. Microbiol. Methods* **64**, 120-125
- Schroevens A. & Britz T. (2003). Influence of different culturing conditions on kefir grain increase. *Int. J. Dairy Technol.* **56**, 183-187
- SSTC (2002). Des risques pour la santé liés à l'alimentation aux normes des produits alimentaires : rapport de synthèse. Bruxelles : Politique scientifique fédérale.
- Stackebrandt E. & Goebel B.M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 846-849
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kämpfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rosselló-Mora R., Swings J., Trüper H.G., Vauterin L., Ward A.C. & Whitman W.B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1043-1047
- Stackebrandt E. (2003). The richness of prokaryotic diversity: there must be a species somewhere. *Food Technol. Biotechnol.* **41**, 17-22
- Stackebrandt E. & Ebers J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today* **33**, 152-155
- Staley J.T. & Krieg N.R. (1984). Classification of procaryotic organisms: an overview. In Krieg N.R. & Holt J.G., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. Baltimore, USA : William & Wilkins, p. 1-4
- Stoesser G., Baker W., van den Broek A.E., Camon E., Garcia-Pastor M., Kanz C., Kulikova T., Lombard V., Lopez R., Parkinson H., Redaschi N., Sterk P., Stoehr P. & Tuli M.A. (2001). The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Res.* **29**, 17-21
- St-Onge M.P., Farnworth E.R., Savard T., Chabot D., Mafu A. & Jones P. (2002). Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. [en ligne]. Accessible sur Internet : < <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/2/1> >, consulté le 14 janvier 2007.
- Suskovic J., Kos B., Matosic S. & Besendorfer V. (2000). The effect of bile salts on survival and morphology of a potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 673-678
- Tada S., Katakura Y., Ninomiya K. & Shioya S. (2007). Fed-batch coculture of *Lactobacillus kefirianofaciens* with *Saccharomyces cerevisiae* for effective production of kefiran. *J. Biosci. Bioeng.* **103**, 557-562
- Tae-Woon K., Jung S.H., Lee J.Y., Choi S.K., Park S.H., Jo J.S. & Kim H.Y. (2003). Identification of lactic acid bacteria in Kimchi using SDS-PAGE profiles of whole cell proteins. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 119-124

- Takizawa S., Kojima S., Tamura S., Fujinaga S., Benno Y. & Nakase T. (1994). *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. *Int. J. System. Bacteriol.* **44**, 435-439
- Takizawa S., Kojima S., Tamura S., Fujinaga S., Benno Y. & Nakase T. (1998). The composition of the lactobacillus flora in kefir grains. *System. Appl. Microbiol.* **21**, 121-127
- Talon R. & Montel M.C. (1994). Activités estérasiqes et lyopolitiques des bactéries lactiques. In de Roissart H. & Luquet F.M., eds. *Bactéries lactiques I*. Uriage, France : Lorica, p. 349-352
- Tannock G.W. (2002). Probiotics and prebiotics: where are we going? In Tannock G.W., ed. *Probiotics and prebiotics: where are we going?* Norfolk, U.K. : Caister Academic Press, p. 1-40
- Temmerman R., Scheirlinck I., Huys G. & Swings J. (2003). Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 220-226
- Temmerman R., Huys G. & Swings J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-independent methods. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 348-359
- Teoh A.L., Heard G. & Cox J. (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **95**, 119-126
- Teuber M. (1995). The genus *Lactococcus*. In Wood B.J.B. & Holzapfel W.H., eds. *The genera of lactic acid bacteria*. London : Chapman & Hall, p.173-234
- Theunissen J., Britz T.J., Torriani S. & Witthuhn R.C. (2005). Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **98**, 11-21
- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680
- Thoreux K. & Schmucker D.L. (2001). Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. *J. Nutr.* **131**, 807-812
- Tilsala-Timisjärvi A. & Alatossava T. (1997). Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **35**, 49-56
- Toba T., Abe S., Arihara K. & Adachi S. (1986). A medium for the isolation of capsular bacteria from kefir grains. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2673-2674
- Toba T., Arihara K., & Adachi S. (1987). Comparative study of polysaccharides from kefir grains, an encapsulated *Lactobacillus* species and *Lactobacillus* kefir. *Milchwiss.* **42**, 565-568
- Tosun H., Seçkin K. & Aktuğ Gönül S. (2007). Acid adaptation effect on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented milk products. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **31**, 61-66
- Umeda C., Sonoyama K., Yamaguchi N., Saito R., Akashi K., Motoshima H. & Kawabata J. (2005). Oral administration of freeze-dried kefir reduces intestinal permeation of oral sensitization to ovalbumine in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 249-251
- Urbach E., Daniels B., Salama M.S., Sandine W.E. & Giovannoni S.J. (1997). The *ldh* phylogeny for environmental isolates of *Lactococcus lactis* is consistent with rRNA genotypes but not with phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 694-702
- Vaillant V., de Valk H, Baron E., Ancelle E., Colin P., Delmas M.C., Dufour B., Pouillot R., Le Strat Y., Weinbreck P., Jouglu E. & Desenclos J.C. (2005). Foodborne infections in France. *Foodborne Pathog. Disease* **2**, 221-232
- Vancanneyt M., Mengaud J., Cleenwerck I., Vanhonacker K., Hoste B., Dawyndt P., Degivry M., Ringuet D., Janssens D. & Swings J. (2004). Reclassification of *Lactobacillus kefirgranum* Takizawa et al. 1994 as *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* subsp. nov. and emended description of *L. kefiranofaciens* Fujisawa et al. 1988. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 551-556
- Vandamme P., Pot B., De Vos P., Kersters K. & Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* **60**, 407-438

- Vanos V. (1991). Importance of streptococci group D in fermented dairy products, as indicators of quality assurance in comparison with coliforms. *Bull. Int. Dairy Fed.* **264**, 20-25
- Varga Zs., Pálvölgyi M., Juhász-Román M. & Tóth-Markus M. (2006). Development of therapeutic kefir-like products with low galactose content for patients with galactose intolerance. *Acta Aliment.* **35**, 295-304
- Vayssier Y. (1978). Le kéfir : analyse qualitative et quantitative. *Rev. Lait. Fr.* **361**, 73-75
- Verstraete W. (2008). Gestion des ressources microbiennes : vers une nouvelle biotechnologie environnementale. Leçon inaugurale de la Chaire Francqui, Gembloux, le 06 mars 2008.
- Vinderola G., Perdigon G., Duarte J., Farnworth E. & Matar C. (2006). Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. *J. Dairy Res.* **73**, 472-479
- Vogel R.F., Böcker G., Stolz P., Ehrmann M., Fanta D., Ludwig W., Pot B., Kerster K., Schleifer K.H. & Hammes W.P. (1994). Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 223-229
- Vujičić I.F., Vulić M. & Könyves T. (1992). Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. *Biotechnol. Lett.* **14**, 847-850
- Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong D., Loach D.M., Munro K. & Alatossava T. (2000). Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 297-303
- Wang Y.Y., Li H.R., Jia S.F., Wu Z.J. & Guo B.H. (2006). Analysis of bacterial diversity of kefir grains by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, **46**, 310-313
- Ward L.J.H., Brown J.C.S. & Davey G.P. (1998). Two methods for genetic differentiation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *cremoris* based on differences in the 16S rRNA gene sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**, 15-20
- Ward L.J.H. & Timmins M.J. (1999). Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letts. Appl. Microbiol.* **29**, 90-92
- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.D.A., Kandler O., Krichevski M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P. & Trüper H.G. (1987). Report of the ad hoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 463-464
- Wiebe G.J., Pershad R., Escobar H., Hawes J.W., Hunter T., Jackson-Machelski E., Knudtson K.L., Robertson M. & Thannhauser T.W. (2003). DNA sequencing research group (DSRG) 2003 – A general survey of core DNA sequencing facilities. *J. Biomol. Tech.* **14**, 231-237
- Wilmes-Riesenberg M.R., Bearson B., Foster J.W. & Curtiss R. (1996). Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **64**, 1085-1092
- Witthuhn R.C., Schoeman T. & Britz T. (2004). Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. *Int. J. Dairy Technol.* **57**, 33-37
- Witthuhn R.C., Schoeman T. & Britz T. (2005). Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. *Int. Dairy J.* **15**, 383-389
- Woese C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271
- Woo P.C.Y., Fung A.M.Y., Lau S.K.P. & Yuen K.Y. (2002). Identification by 16S rRNA gene sequencing of *Lactobacillus salivarius* bacteremic cholecystitis. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 265-267
- Wood B.J.B. (1995). The lactic acid bacteria. In Wood B.J.B. & Holzapfel W.H., eds. *The genera of lactic acid bacteria*. London : Chapman & Hall, series preface
- Wszolek M., Tamine Y.A., Muir D.D. & Barclay M.N.I. (2001). Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **34**, 251-261
- Wuyts J., Perrière G. & Van de Peer Y. (2004). The European ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Res.* **32**, D101-D103

- Yabuuchi E., Kaneko T., Yano I., Moss W.C. & Miyoshi N. (1983). *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spiritovorum* comb. nov., *Sphingobacterium multivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov. and *Flavobacterium indologenes* sp. nov.: glucose-non fermenting Gram negative rods in CDC group IIK-2 and IIB. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 580-598
- Yaman H., Ulukanl Z., Elmali M. & Unal Y. (2006). The effect of a fermented probiotic, the kefir, on intestinal flora of poultry domesticated geese. *Rev. Med. Vet.* **157**, 379-386
- Yang D. & Woese C.R. (1989). Phylogenetic structure of the 'leuconostocs': An interesting case of a rapidly evolving organism. *Syst. Appl. Microbiol.* **12**, 145-149
- Yokoi H., Watanabe T., Fujii Y., Toba T. & Adachi S. (1990). Isolation and characterization of polysaccharide-producing bacteria from kefir grains. *J. Dairy Sci.* **73**, 1684-1689
- Yoshida Y., Palmer R.J., Yang J., Kolendrand P.E. & Cisar J.O. (2006). Streptococcal receptor polysaccharides: recognition molecules for oral biofilm formation. *BMC Oral Health* **6**, S12
- Zacconi C., Scolari G., Vescovo M. & Sarra P.G. (2003). Competitive exclusion of *Campylobacter jejuni* by kefir fermented milk. *Ann. Microbiol.* **53**, 179-187
- Zhang G. & Holley R.A. (1999). Development and PFGE monitoring of dominance among spoilage lactic acid bacteria from cured meats. *Food Microbiol.* **16**, 633-644
- Zourari A. & Anifantakis E.M. (1988). Le kéfir - Caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. Technologie de production. *Lait* **68**, 373-392

LISTE DES DOCUMENTS PUBLIÉS DANS LE CONTEXTE DE CE TRAVAIL

Articles soumis à un comité de lecture

- Ninane V., Berben G., Romnee J.M. & Oger R. (2005). Variability of the microbial abundance of a kefir grain starter cultivated in partially controlled conditions. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **9**, 191-194
- Ninane V., Mukandayambaje R. & Berben G. (2007). Identification of lactic acid bacteria within the consortium of a kefir grain by sequencing 16S rDNA variable regions. *J. AOAC Int.* **90**, 1111-1117
- Ninane V., Mukandayambaje R. & Berben G. (2009). Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets de santé du kéfir. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**, (sous presse)

Actes de congrès

- Rondia P., Dehareng F., Beckers Y., Ninane V., Laloux J. et Wavreille J. (2005). Différenciation et fonctionnalité des produits agricoles. In *L'Elevage: hier, aujourd'hui, demain. Quelles attentes? Pour quels enjeux?* Actes 10ème Carrefour Prod. Anim., Gembloux, Belgique, 26 janvier 2005. Gembloux, Belgique : CRA-W – FUSAGX.
- Ninane V., Dehareng F. Oger R. & Berben G. (2005). Conjugated linoleic acid content of kefir. In *Prospects for health, well-being and safety*, Proc. Fourth Nizo Dairy Conf., Papendal, The Netherlands, 15-17 June 2005. Oxford, UK : Elsevier.
- Ninane V., Dehareng F., Laloux J. (2006). Les transformations fermières du lait. In *Le lait... une filière dynamique*, Actes 11ème Carrefour Prod. Anim., Gembloux, Belgique, 25 janvier 2006. Gembloux, Belgique : CRA-W – FUSAGX., p. 59-65
- Wavreille J, Ninane V, Vandeplass S, Beckers Y, Bartiaux-Thill N. (2006). Les probiotiques en alimentation animale et la qualité de la viande. In *Microbiologie et viande : que faire demain ?* Actes Journ. Etud. BAMST, Gembloux, Belgique, 05 avril 2006. Gembloux, Belgique : CRA-W, p. 55-62
- Ninane V., Mukandayambaje R. & Berben G. (2006). Use of 16S rRNA V1 region analysis for the identification of lactobacilli occurring in a kefir grain. In *Scientific and technological challenges in fermented milk*, Proc. Second IDF Dairy Sci. Technol. Week, Sirmione Italy 15-19 May 2006. Bruxelles : FIL-IDF.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1.1** : Illustration de grains de kéfir (Marshall & Cole, 1984) ; a : grain en forme de "feuille" ; b : grain en forme de "feuille enroulée" ; c & d : grain de forme non définie ; e & f : grain en forme de "chou-fleur". Reproduit avec l'aimable autorisation de la Fédération internationale de laiterie (FIL-IDF, Building Diamant, 80 Bd A. Reyers, 1030 Bruxelles, Belgique). 13
- Figure 1.1.2** : Illustration d'un grain de kéfir en grossissement de 7000 X (Guzel-Seydim *et al.*, 2005). Reproduit avec l'aimable autorisation de Wiley-Blackwell Publishing (Oxford, UK). 14
- Figure 1.1.3** : Illustration de l'unité de six sucres, du D-glucose (D-G) ou du D-galactose (D-Gal), répétée dans la structure du kéfirane telle que proposée par Kooiman (1968). 21
- Figure 3.1.1** : Evolution de l'acidité du grain de kéfir KJ au cours d'un cycle de culture de 24 heures. 78
- Figure 3.2.2** : Visualisation du développement microbien du grain à l'aide d'un substrat chromogène (X-gal). La répartition des micro-organismes capables de métaboliser le X-gal, zones foncées, était hétérogène après un jour de culture sans agitation (a I et a II), tandis qu'elle était homogène lorsque la culture était agitée (b). Les prélèvements microbiens destinés à vérifier la présence de micro-organismes capables de métaboliser le X-gal dans les zones restées inactives du grain ont été effectués aux endroits indiqués par les flèches (a I). 84
- Figure 3.3.1** : Variabilité des nucléotides successifs de l'ADNr 16S de bactéries lactiques, schématisée à partir de l'alignement des 16 séquences indiquées par un astérisque dans le Tableau 3.3.1. Le nombre de nucléotides différents en une position donnée de l'alignement est représenté par les symboles suivants : • pour 1 même nucléotide dans toutes les séquences de bactéries lactiques alignées ; ◦, ◐ et ◑ pour respectivement 2, 3 et 4 nucléotides différents. Les régions variables V1, V2 et V3 sont soulignées et identifiées dans la marge de gauche. 88
- Figure 3.3.2** : Alignement de la région V1 de l'ADNr 16S de bactéries lactiques dont les numéros d'accèsion sont donnés dans le Tableau 3.3.1. Les séquences sont écrites dans le sens 5' → 3', avec, en marges, le nom de l'espèce dont elles sont issues et le nombre de nucléotides qu'elles comportent. Les séquences de certaines espèces incluent les séquences de plusieurs opérons ou sous-espèces pouvant comporter des différences nucléotidiques. Le cas échéant, les nucléotides différents sont identifiés par la lettre symbolique, soulignée, du code de l'Union internationale de biochimie (Cornish-Bowden, 1985) donné en Annexe II. A chaque position de la séquence, les nucléotides identiques sont indiqués par un même contraste monochrome entre le fond et le caractère. 90
- Figure 3.3.3** : Alignement des régions V2 et V3 de l'ADNr 16S de leuconostocs dont les numéros d'accèsion sont donnés dans le Tableau 3.3.1. Les séquences sont écrites dans le sens 5' → 3', avec, en marges, le nom de l'espèce dont elles sont issues et le nombre de nucléotides qu'elles comportent. A chaque position de la séquence, les nucléotides identiques sont indiqués par un même contraste monochrome entre le fond et le caractère. 91
- Figure 3.3.4** : Représentation schématique des fragments amplifiés avec l'amorce commune aux lactobacilles (R350), ou spécifique aux coques lactiques plus leuconostocs (R485), combinée avec l'amorce bactérienne universelle 27F décrite par Rochelle *et al.* (1992). Les régions variables V1 et V2 de l'ADNr 16S sont représentées par les zones hachurées. Les positions des nucléotides terminaux des régions variables et des amorces, dans l'ADNr 16S de *Escherichia coli* numéro d'accèsion X80725 (Cilia *et al.*, 1996), sont données par les nombres surmontant les flèches les pointant. 93
- Figure 3.3.5** : Rendements de l'extraction de l'ADN génomique de *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* et *Lb. kefiri* en trois répétitions chacun. Migration en gel d'agarose de quantités d'extraits ajustés en fonction du poids des culots cellulaires. 95
- Figure 3.3.6** : Séquences de la région V1 de l'ADNr 16S de 83 + 21 fragments issus du grain de kéfir KJ, classées en groupes de similarité notés de A à E. Les séquences des groupes A, B et C comportaient des

différences entre-elles ; les nucléotides différents sont indiqués en caractères gras tandis que les nucléotides identiques à ceux de la séquence consensus sont représentés par des points. La fréquence de chaque séquence est indiquée dans la marge de gauche. Les séquences ont été enregistrées dans la banque de l'EMBL sous les numéros d'accèsion AM419051, AM419054, AM419055, AM419056 et AM419052 respectivement pour les groupes A, B, C, D et E. 97

Figure 3.3.7 : Séquence de la région V2 de l'ADNr 16S des 3 fragments du groupe E. Les séquences des trois fragments différaient d'un nucléotide indiqué en caractère gras avec, en regard, le nucléotide de substitution. La séquence du groupe a été enregistrée dans la banque de l'EMBL sous le numéro d'accèsion AM419053. 99

Figure 3.4.1 : Comparaison du profil de migration des protéines, par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), de la souche isolée du kéfir KJ avec les profils de souches de leuconostocs provenant du Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (Gand, Belgique). Les souches à l'origine des profils sont identifiées dans la marge de droite ; la souche isolée du kéfir KJ est identifiée sous le numéro ID10403 tandis que celles provenant de la collection sont identifiées par leur numéro de référence, complété par la lettre T pour les souches types. Les sous-espèces de *Leuconostoc mesenteroides* sont respectivement : (I) *cremoris*, (II) *mesenteroides* et (III) *dextranicum*. Le degré de similarité entre les profils est représenté par le dendrogramme donné dans la marge de gauche. 108

Figure 3.4.2 : Arbre phylogénétique établi à partir de la séquence partielle de l'ADNr 16S de l'isolat du kéfir KJ et des souches types de diverses espèces acétiques. Les souches à l'origine des séquences sont identifiées dans la marge de droite ; celle isolée du kéfir KJ est identifiée sous le numéro ID10595. Les numéros d'accèsion des séquences des souches types sont donnés à l'extrême droite. La distance entre les séquences, en terme de différences nucléotidiques, est représentée par la longueur des "branches" de l'arbre représenté dans la marge de gauche. 109

Figure 3.5.1 : Structure des cultures microbiennes développées après 2 semaines d'incubation en aérobie (I) et en anaérobie (II) dans les bouillons M 17, MRS_{5,4}, Rogosa-CW et KPL à partir d'un extrait du grain KJ. Les biofilms formés dans le fond des boîtes de Petri ont été brisés par agitation. 115

Figure 3.5.2 : Biofilm formé à la surface du laitensemencé par le consortium reconstitué à partir des micro-organismes individuels isolés du grain KJ. Le biofilm est présenté dans de l'eau et a été froissé à l'occasion de la manipulation. Constitué de matière collante, il n'a pas été possible de le redéployer. 128

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.1.1, 1^{ère} partie** : Composition microbienne de grains de kéfir. Les différentes espèces sont mentionnées sous leur appellation actuelle ; un tableau reprenant les anciennes dénominations utilisées par les différents auteurs est donné en Annexe I. 16
- Tableau 1.1.1, 2^{ème} partie** : Composition microbienne de grains de kéfir. Les différentes espèces sont mentionnées sous leur appellation actuelle ; un tableau reprenant les anciennes dénominations utilisées par les différents auteurs est donné en Annexe I. 17
- Tableau 1.1.1, 3^{ème} partie** : Composition microbienne de grains de kéfir. Les différentes espèces sont mentionnées sous leur appellation actuelle ; un tableau reprenant les anciennes dénominations utilisées par les différents auteurs est donné en Annexe I. 18
- Tableau 1.1.1, 4^{ème} partie** : Composition microbienne de grains de kéfir. Les différentes espèces sont mentionnées sous leur appellation actuelle ; un tableau reprenant les anciennes dénominations utilisées par les différents auteurs est donné en Annexe I. 19
- Tableau 2.2.1** : Méthodes appliquées pour la recherche des germes pathogènes et indicateurs de défaut d'hygiène. 60
- Tableau 2.3.1** : Conditions de culture appliquées pour l'isolement et l'énumération des groupes microbiens du grain. 62
- Tableau 2.6.1** : Conditions de préculture des souches microbiennes utilisées dans les essais mis en œuvre à partir du consortium reconstitué. 73
- Tableau 2.6.2** : Conditions de culture des témoins de croissance des souches individuelles utilisées dans les essais de formation de biofilms à partir du consortium reconstitué. 75
- Tableau 3.1.1** : Qualité hygiénique du lait fermenté à partir du grain de kéfir KJ (juin 2007). 79
- Tableau 3.2.1** : Coloration de Gram, réaction au test de catalase et morphologie cellulaire des bactéries développées sur les milieux de culture sélectifs. 81
- Tableau 3.2.2** : Dénombrements des groupes microbiens participant au consortium du grain de kéfir KJ. 82
- Tableau 3.2.3** : Dénombrements des groupes microbiens du grain de kéfir KJ soumis à des conditions de culture différentes par rapport à celles appliquées habituellement. 83
- Tableau 3.3.1** : Séquences de l'European Molecular Biology Laboratory (Stoesser *et al.*, 2001) utilisées pour identifier les régions variables de l'ADNr 16S des bactéries lactiques ciblées. 86
- Tableau 3.4.1** : Profils fermentaires des lactobacilles homofermentaires isolés du grain de kéfir KJ (R-CW et KPL). Le profil fermentaire de la souche type (T a1) du taxon assigné aux isolats KJ ainsi que ceux déduits de la description bibliographique du taxon (Réf. a1) et du taxon apparenté (Réf. a2) sont juxtaposés aux profils des isolats KJ. 104
- Tableau 3.4.2** : Profils fermentaires des lactobacilles hétérofermentaires isolés du grain de kéfir KJ (R-CW et KPL). Les profils fermentaires des souches types (T b et T c) des taxons assignés aux isolats KJ ainsi que ceux déduits de leur description bibliographique (Réf. b et Réf. c) sont juxtaposés aux profils des isolats KJ. 105
- Tableau 3.4.3** : Profils fermentaires des coques lactiques et des leuconostocs isolés du grain de kéfir KJ (RM). Le profil fermentaire de la souche type (T d) du taxon assigné aux coques lactiques isolés du grain, celui déduit de sa description bibliographique (Réf. d) et ceux de divers leuconostocs (Réf. e1, Réf. e2 et Réf. e3) sont juxtaposés aux profils des isolats KJ. 106

Tableau 3.5.1 : Nombre et taille des structures de grain récoltées dans les laits fermentés à partir d'un extrait de grain grossièrement filtré. 119

Tableau 3.5.2 : Aspect des laitsensemencés avec des extraits du grain KJ, après 2 semaines d'incubation à 22 °C. Les données concernent la structure (Structure) ainsi que la texture et le pH des gels après homogénéisation (Texture/pH) ou le pH des liquides (pH_{liquide}). 121

Tableau 3.5.3 : Aspect des laitsensemencés avec le consortium reconstitué à partir des micro-organismes isolés du grain KJ, après 2 semaines d'incubation à 22 °C. Les données concernent la structure (Structure) ainsi que la texture et le pH des gels après homogénéisation (Texture/pH) ou le pH des liquides (pH_{liquide}). 126

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----------|
| RÉSUMÉ | 3 |
| SUMMARY | 7 |
| 1 INTRODUCTION | 11 |
| 1.1 Grains de kéfir | 13 |
| 1.1.1 Structure des grains de kéfir | 13 |
| 1.1.2 Microflore des grains de kéfir | 15 |
| Composition microbienne qualitative des grains de kéfir | 15 |
| Composition microbienne quantitative des grains de kéfir | 19 |
| 1.1.3 Matrice des grains de kéfir | 21 |
| 1.1.4 Formation du grain de kéfir | 22 |
| 1.2 Préparation et qualité du kéfir | 24 |
| 1.2.1 Contribution des différents groupes microbiens aux transformations du lait | 24 |
| Acidification du lait | 24 |
| Synthèse de composés aromatisants | 25 |
| Synthèse d'agents texturants | 26 |
| Lipolyse | 27 |
| Synthèse d'acide linoléique conjugué | 27 |
| Fermentation alcoolique | 28 |
| 1.2.2 Procédés de fabrication | 28 |
| Qualité du lait | 28 |
| Préparation traditionnelle | 29 |
| Procédés industriels | 29 |
| Préparation du levain | 29 |
| Préparation du kéfir | 31 |
| 1.2.3 Composition du lait fermenté | 32 |
| Acides organiques | 32 |
| Lactose | 33 |
| Composés aromatisants | 33 |
| Protéines, matière grasse et acide linoléique conjugué | 33 |
| Alcool et CO ₂ | 34 |
| 1.3 Perspectives de développement | 35 |
| 1.3.1 Réputation du kéfir | 35 |
| 1.3.2 Notions de probiotique et d'aliment fonctionnel | 36 |
| Probiotiques | 36 |
| Aliments fonctionnels | 37 |
| 1.3.3 Contexte réglementaire | 38 |
| Application médicamenteuse | 38 |
| Application alimentaire | 39 |
| Application zootechnique | 40 |
| 1.3.4 Avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir | 41 |
| 1.4 Méthodes d'identification des bactéries lactiques | 46 |
| 1.4.1 Notion d'espèce bactérienne | 46 |
| 1.4.2 Identification microbienne | 49 |
| 1.4.3 Méthodes phénotypiques | 49 |
| 1.4.4 Méthodes physico-chimiques | 50 |
| Profils protéiques | 50 |
| Spectres infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF) | 50 |
| 1.4.5 Méthodes génotypiques | 51 |
| Hybridation ADN-ADN et stabilité thermique des hybrides | 51 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| | Séquençage de l'ADNr | 51 |
| | Typage moléculaire | 53 |
| | Hybridation spécifique | 55 |
| 1.5 | Objectifs du travail | 55 |
| 2 | MATÉRIEL ET MÉTHODES | 59 |
| 2.1 | Matériel biologique | 59 |
| 2.1.1 | Origine et maintenance du grain de kéfir KJ | 59 |
| 2.1.2 | Origine des souches de référence | 59 |
| 2.2 | Qualité hygiénique du grain de kéfir KJ | 60 |
| 2.2.1 | Mesure du pH du grain | 60 |
| 2.2.2 | Recherche des germes pathogènes et indicateurs de défauts d'hygiène | 60 |
| 2.3 | Identification et quantification des groupes microbiens du grain de kéfir KJ | 61 |
| 2.3.1 | Identification des groupes microbiens | 61 |
| 2.3.2 | Dénombrements des groupes microbiens | 61 |
| | Echantillonnage et préparation des dilutions en vue des dénombrements | 61 |
| | Méthodes de dénombrement | 61 |
| | Estimation de la précision des méthodes de dénombrement | 62 |
| | Traitement des données | 62 |
| 2.3.3 | Statistiques des essais répétés dans le temps | 63 |
| 2.3.4 | Activité β -galactosidase de la microflore du grain | 63 |
| 2.4 | Identification moléculaire des bactéries lactiques du grain de kéfir KJ | 64 |
| 2.4.1 | Comparaison des séquences de l'European Molecular Biology Laboratory | 64 |
| 2.4.2 | Séquences bordant les régions V1, V2 et V3 de l'ADNr 16S | 64 |
| 2.4.3 | Taux de variabilité des nucléotides | 64 |
| 2.4.4 | Stratégie d'isolement et d'identification de l'ADN ciblé | 65 |
| 2.4.5 | Extraction de l'ADN génomique | 65 |
| | Méthode d'extraction | 65 |
| | Rendement de la méthode d'extraction | 66 |
| 2.4.6 | Amplification des fragments ciblés d'ADN | 66 |
| 2.4.7 | Clonage des fragments d'ADN | 67 |
| 2.4.8 | Extraction de l'ADN plasmidique des clones de Escherichia coli | 67 |
| 2.4.9 | Séquençage des inserts | 68 |
| | Estimation du nombre de fragments à séquencer | 68 |
| | Méthode de séquençage | 68 |
| | Traitement des séquences | 69 |
| 2.5 | Isolement des micro-organismes du grain de kéfir KJ et identification des isolats | 69 |
| 2.5.1 | Isolement des micro-organismes du grain de kéfir | 69 |
| | Mise en culture | 69 |
| | Amplifications géniques pour la sélection des isolats de lactobacilles | 70 |
| | Purification des isolats | 70 |
| 2.5.2 | Tests d'identification | 71 |
| | Bactéries lactiques | 71 |
| | Bactérie acétique | 72 |
| | Levure | 72 |
| 2.6 | Formation du grain de kéfir KJ | 73 |
| 2.6.1 | Préparation des extraits de grain | 73 |
| 2.6.2 | Conditions de préculture des souches individuelles | 73 |
| 2.6.3 | Bouillons de synthèse utilisés pour vérifier les propriétés d'agglutination du consortium | 74 |
| 2.6.4 | Bouillons à base de lait utilisés dans les essais d'aptitude du lait à la croissance et dans les essais de formation de biofilms | 74 |
| 2.6.5 | Taux d'ensemencement des bouillons | 74 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 2.6.6 | Conditions de culture des témoins de croissance des souches individuelles | 75 |
| 3 | RÉSULTATS | 77 |
| 3.1 | Qualité hygiénique du grain de kéfir KJ | 77 |
| 3.1.1 | Evolution du pH du grain au cours des cycles hebdomadaires de culture | 77 |
| 3.1.2 | Germes pathogènes et indicateurs de défauts d'hygiène | 78 |
| 3.2 | Identification et quantification des groupes microbiens du grain de kéfir KJ | 79 |
| 3.2.1 | Identification des groupes microbiens du grain | 79 |
| 3.2.2 | Quantification des groupes microbiens du grain | 81 |
| 3.2.3 | Identification des conditions de culture à l'origine de la variabilité des abondances microbiennes dans le grain de kéfir | 83 |
| | Influence de séjours répétés dans de l'eau et du rinçage des grains sur l'abondance du grain en lactobacilles, en coques lactiques et en levures | 83 |
| | Influence de l'agitation des grains pendant la fermentation sur l'activité β -galactosidase du consortium | 84 |
| 3.3 | Identification moléculaire des bactéries lactiques du grain de kéfir KJ | 85 |
| 3.3.1 | Identification des régions variables de l'ADNr 16S | 85 |
| | Sélection des séquences | 85 |
| | Localisation des régions variables de l'ADNr 16S | 87 |
| | Détermination de l'applicabilité des régions variables à la différenciation des espèces | 89 |
| 3.3.2 | Détermination des amorces d'amplification génique | 92 |
| 3.3.3 | Nombre de fragments analysés | 94 |
| 3.3.4 | Analyse des séquences | 95 |
| | Classement des séquences de la région V1 de l'ADNr 16S | 96 |
| | Identification moléculaire des bactéries du grain à partir de la région V1 | 96 |
| | Identification des leuconostocs à partir de la région V2 de l'ADNr 16S | 99 |
| 3.4 | Identification des isolats microbiens | 100 |
| 3.4.1 | Isolement des souches microbiennes | 100 |
| 3.4.2 | Identification des isolats de lactobacilles | 101 |
| 3.4.3 | Identification des isolats de coques lactiques | 103 |
| 3.4.4 | Identification des isolats de leuconostoc | 103 |
| 3.4.5 | Identification de l'isolat acétique | 108 |
| 3.4.6 | Identification de l'isolat de levure | 110 |
| 3.5 | Formation du grain de kéfir KJ | 111 |
| 3.5.1 | Concepts sous-tendant les essais de reconstitution du grain | 111 |
| 3.5.2 | Essais de reconstitution du grain à partir du consortium microbien extrait du grain | 111 |
| | Cycles de culture | 112 |
| | Durée des essais | 113 |
| | Structure des caillés au terme des essais | 114 |
| 3.5.3 | Agglutination en milieu de synthèse du consortium microbien extrait du grain | 114 |
| 3.5.4 | Aptitude du lait nature et modifié à la croissance de fragments de grain | 115 |
| | Caractérisation des extraits de grain | 117 |
| | Taux d'ensemencement des laits avec les extraits | 117 |
| | Structures apparentées à des grains récoltées dans les laits fermentés | 118 |
| | Conditions favorables à la croissance et/ou à la préservation de petites structures de grain | 119 |
| 3.5.5 | Activités de biosynthèse du consortium microbien extrait du grain | 120 |
| | Expression des activités de biosynthèse | 120 |
| | Identification des activités de biosynthèse variables et de leurs acteurs | 122 |
| | Origine de la variabilité des activités de biosynthèse | 123 |
| 3.5.6 | Activités de biosynthèse du consortium reconstitué à partir des souches individuelles | 124 |
| | Conception des essais | 124 |
| | Aspect des gels | 125 |
| | Structures microbiennes | 125 |
| 3.5.7 | Comportement des souches individuelles | 126 |
| | | 195 |

| | | |
|------------|---|------------|
| | Croissance des souches individuelles | 126 |
| | Agglutination des souches individuelles | 127 |
| 3.5.8 | Aspect des biofilms | 128 |
| 4 | DISCUSSION | 129 |
| 4.1 | Qualité hygiénique du grain de kéfir KJ | 129 |
| 4.1.1 | Sensibilité du grain à des germes contaminants | 129 |
| 4.1.2 | Germes pathogènes et indicateurs de défauts d'hygiène | 131 |
| 4.2 | Identification et quantification des groupes microbiens du grain de kéfir KJ | 133 |
| 4.2.1 | Identification des groupes microbiens | 133 |
| 4.2.2 | Quantification des groupes microbiens | 135 |
| 4.2.3 | Origine de la variabilité de l'abondance des groupes microbiens | 136 |
| 4.3 | Identification moléculaire des bactéries lactiques du grain de kéfir KJ | 139 |
| 4.3.1 | Pertinence du choix de l'approche | 140 |
| 4.3.2 | Domaine d'application de la cible moléculaire | 141 |
| 4.3.3 | Adéquation des courtes séquences de l'ADNr 16S à l'identification des bactéries ciblées | 142 |
| 4.3.4 | Degré de confiance de l'identification moléculaire | 144 |
| 4.3.5 | Sensibilité de la méthodologie | 144 |
| 4.4 | Composition microbienne du grain de kéfir KJ | 146 |
| 4.4.1 | Bactéries lactiques | 147 |
| | Caractéristiques taxonomiques | 147 |
| | Production de kéfirane | 147 |
| | Diversité | 148 |
| 4.4.2 | Levures | 149 |
| 4.4.3 | Bactéries acétiques | 149 |
| 4.5 | Formation du grain de kéfir KJ | 149 |
| 4.5.1 | Constitution in vitro d'une structure de Gingerbeer plant : applicabilité aux grains de kéfir | 149 |
| 4.5.2 | Processus de formation par croissance d'ébauches de grain | 150 |
| 4.5.3 | Adéquation des essais à l'établissement d'un processus de formation par croissance d'ébauches de grain | 151 |
| 4.5.4 | Adéquation du lait à la croissance d'ébauches de grain | 153 |
| 4.5.5 | Hypothèse de formation de grains par l'intermédiaire d'un biofilm | 154 |
| 4.5.6 | Adéquation du consortium microbien à la genèse de grains | 155 |
| 5 | CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 157 |
| 5.1 | Caractéristiques microbiennes du grain de kéfir KJ | 157 |
| 5.1.1 | Flore contaminante | 157 |
| 5.1.2 | Flore banale | 158 |
| 5.1.3 | Variabilité quantitative de la microflore | 160 |
| 5.2 | Atouts, contraintes et performances de la méthode moléculaire d'identification des bactéries lactiques | 160 |
| 5.2.1 | Universalité et indépendance vis-à-vis d'une connaissance pré-déterminée des espèces recherchées | 160 |
| 5.2.2 | Indépendance vis-à-vis d'isolements par culture | 161 |
| 5.2.3 | Sensibilité | 161 |
| 5.2.4 | Fiabilité et limitations | 162 |
| 5.2.5 | Perspectives d'application | 162 |
| 5.3 | Avancées en matière de reconstitution d'un grain de kéfir | 162 |
| 5.3.1 | Paramètres microbiens déterminant la formation de structures | 162 |
| 5.3.2 | Hypothèse de formation de grains par l'intermédiaire de biofilms | 164 |
| 5.3.3 | Rôle des différents micro-organismes dans la formation des grains | 165 |

| | |
|--|------------|
| ANNEXE I : ANCIENNES DÉNOMINATIONS DES MICRO-ORGANISMES DU KÉFIR | 167 |
| ANNEXE II : CODE DES ACIDES NUCLÉIQUES DE L'UNION INTERNATIONALE DE BIOCHIMIE (CORNISH-BOWDEN, 1985). | 169 |
| BIBLIOGRAPHIE | 171 |
| LISTE DES DOCUMENTS PUBLIÉS DANS LE CONTEXTE DE CE TRAVAIL | 187 |
| Articles soumis à un comité de lecture | 187 |
| Actes de congrès | 187 |
| LISTE DES FIGURES | 189 |
| LISTE DES TABLEAUX | 191 |
| TABLE DES MATIÈRES | 193 |