

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

-جامعه محمد الصديق بن يحي -جيجل

Université Mohammed Seddik Ben yahia-Jijel-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie Appliquée et
Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية وعلوم التغذية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Identification phénotypique et moléculaire des
bactéries lactiques

Membres du Jury

Présidente : M^{me}. W. Benhamada

Examinatrice : Dr. S. Alioua

Encadreur : Mr .Y. Rahmoune

Présenté par

Benhamada Amina

Boudjerida Kaouter

Mati Amira

Année Universitaire : 2019 - 2020

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions le Dieu de nous avoir permis de terminer cette recherche.

Nous tenons à remercier exceptionnellement notre professeur et notre directeur de recherche Monsieur **Yazid Rahmoune**, pour son soutien permanent, pour ses conseils, ses orientations, et pour son aide et sa solidarité,

Ce travail et l'aboutissement d'un long cheminement au cours duquel nous avons bénéficié de l'encadrement, des encouragements et du soutien de plusieurs personnes, à qui nous tenons à dire profondément et sincèrement merci.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury : Mme **Benhamada Wahiba** et Dr. **Alioua Souad**, pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail en acceptant de l'examiner pour l'enrichir par leurs propositions,

Un grand merci à nos parents, vous nous avez soutenu et encouragé tout au long de nos études et permis d'arriver jusque-là...sans vous rien n'aurait été possible.

Nos remerciements vont enfin à toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, ainsi que l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation.

Dédicaces

Merci Allah de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la
force d'y croire et la patience d'aller jusqu'au bout du rêve...

À celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon
bonheur et ma réussite, à ma mère

À mon père, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant
toutes les années de mes études, et qui a veillé tout au long de ma vie

À m'encourager, à me donner de l'aide et à me protéger,

Vous avez comblé ma vie d'affection et de compréhension, vous avez toujours été
présents à mes côtés pour me consoler quand il fallait,

Rien au monde ne pourrait compenser les efforts et les sacrifices que vous avez consentis

Pour mon bien être, et la poursuite de mes études dans de bonnes conditions,

Aucune dédicace, ne saurait exprimer à sa juste valeur le profond amour que je vous porte

Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon

Mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir,

Puisse Dieu, vous procure santé, bonheur et longue vie...

À mes adorables sœurs **Imane, Asma, Soumia, Hala, Noure el houda et Bochra.**

A mes frères **Amine, Oussama, Abd el moumine, Abd el basset et Imad Eddine.**

A mes belles nièces : **Nahla, Meriem, Lina, Sara, et Inass.**

A mes adorables neveux : **Ayman, Ayoub, Adam, Anes et Abd errahmane.**

A mes belle-sœurs **Meriem, Zina** et ma nièce **Sidra.**

À mon amie **Amira** avec laquelle j'ai partagé tous les bons moments de mon cursus et que je ne saurai
récompenser pour son amitié. Tu as toujours été soucieuse de mon parcours. Merci
infiniment pour ta sympathie, tes conseils et ton soutien constant.

À tous(es) mes amis(es),

À tous ceux qui m'aiment,

À tous ceux que j'aime,

Je dédie ce modeste travail...

Kaouter.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ma chère mère qui nous a quitté trop tôt mais qui reste vivante dans mon cœur pour me donner un coup de pouce pour réussir ma vie.

A la mémoire de mon père mort il y a déjà 18 ans, que DIEU garde son âme dans son vaste paradis.

A la lumière de mes jours, ma sœur jumelle **Amira** que j'adore.

A tous les membres de ma famille, surtout à ma belle **souhila** et ma nièce **khaoula**.

Je leurs souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.

A tous mes amies et mes collègues de promotion 2^{ème} année Master Microbiologie Appliquée.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis
Merci.

Amina.

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À :

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Mes frères **Abdrahman**, **abdelmoumen** et **abdeljalil**, pour votre soutien et encouragements, vous occupez une place particulière dans mon cœur. Je vous dédie ce travail en vous souhaitant un avenir radieux, plein de bonheur et de succès.

Ma meilleure amie **Kaouter**, à qui je souhaite le succès pour l'amitié qui nous a toujours unis. Merci pour tous ces bons moments que nous avons passés ensemble, que j'espère encore continuer.

Ma famille maternelle et paternelle et toutes les personnes qui me sont chères.

Enfin, à tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail. Et Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

A vous tous, un grand Merci

Amira.

Sommaire

Liste des abréviations	I
Liste des tableaux	III
Liste des figures	IV
Introduction	1
Chapitre I : Généralités sur les bactéries lactiques	
I.1. Historique des bactéries lactiques	2
I.2. Description générale des bactéries lactiques.....	2
I.3. Taxonomie des bactéries lactiques	6
I.4. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques	7
I.4.1. Le genre <i>Streptococcus</i>	7
I.4.2. Le genre <i>Lactococcus</i>	8
I.4.3. Le genre <i>Enterococcus</i>	9
I.4.4. Le genre <i>Pediococcus</i>	9
I.4.5. Le genre <i>Lactobacillus</i>	10
I.4.6. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	12
Chapitre II : Identification phénotypique des bactéries lactiques.	
II.1. Historique de l'identification phénotypique	14
II.2. Définition du terme identification phénotypique.....	14
II.2.1. Aspect morphologique	14
II.2.2. Aspect physiologique	15
II.2.3. Aspect biochimique	15
II.2.3.1. Identification par la composition de la paroi cellulaire	16
II.2.3.2. Identification par le profil des acides gras	21
II.2.3.3. Identification par l'analyse des protéines	23
II.2.3.4. FTIR (Identification par la spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier).....	27
Chapitre III : Identification moléculaire des bactéries lactiques.	
III.1. Historique de l'identification moléculaire.....	29
III.2. Définition du terme identification moléculaire	29
III.3. Les acides nucléiques des bactéries lactiques et leur extraction	30

III.4. Méthode d'identification moléculaire des bactéries lactiques	31
III.4.1 Méthodes étudiant la structure des acides nucléiques	32
III.4.1.1 Le contenu en GC	32
III.4.1.2 Hybridation ADN-ADN	33
III.4.1.3 Séquençage de l'ADN ribosomal 16S	34
III.4.2 Méthodes de typages basées sur l'ADN	35
III.4.2.1 La technique RAPD (ADN polymorphe amplifié de manière aléatoire)	35
III.4.2.2. La technique PFGE (Electrophorèse sur gel en champ pulsé)	37
III.4.2.3. La technique RFLP (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction amplifiés).....	41
III.4.2.4. La technique AFLP (Polymorphisme des fragments de longueur amplifiée).....	43
III.4.2.5. La technique ARDRA (Analyse de restriction de l'ADN ribosomique amplifié)	44
III.4.2.6. La PCR en temps réel	46
III.4.2.7. Techniques ribotypages	48
III.4.3 Méthodes pour étudier les populations complexes	49
III.4.3.1 Les techniques DGGE (Electrophorèse sur gel à gradient de dénaturation) et TGGE (Electrophorèse sur gel à gradient de température)	49
III.5. Les avantages et les limites de l'identification moléculaire	50
Conclusion	52
Références bibliographiques.....	53
Résumé	

Introduction

Introduction

Les bactéries lactiques jouent un rôle important dans les fermentations industrielles et dans le domaine de la santé. Elles englobent un groupe hétérogène de micro-organismes, comprend différents genres tel que: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, etc (1).

Les bactéries lactiques sont des bactéries Gram-positives, non sporulantes, microaérophiles, tolérantes aux acides et produisent de l'acide lactique comme principal produit de fermentation (2).

Ces microorganismes ont des génomes relativement petits (au moyenne 2 Méga-bases, avec une capacité de codage de 2 000 gènes ainsi que des pseudogènes), 0% à 4,8% de ce contenu est représenté par des plasmides, et le nombre total de gènes codant pour des protéines varie entre 1 700 à 2 800 (2).

L'identification phénotypique conventionnelle des bactéries lactiques dépend principalement des critères morphologiques (la coloration de Gram, la forme des cellules, la formation de spores...), physiologiques (la production d'enzymes et la fermentation de différents glucides...) et biochimiques (détermination de : profile des acides gras, types de peptidoglycane, profiles des protéines cellulaires, etc.). Cependant, et par le fait que de nombreuses bactéries lactiques ont des traits morphologiques et des besoins nutritionnels de croissance presque similaires, cette identification demeure non concluante et insuffisante pour caractériser et différencier les espèces, les sous-espèces et les souches du même genre (1).

Actuellement, de nouvelles méthodes génotypiques ont été développées et utilisées efficacement pour la définition de bactéries telles que le séquençage de l'ARNr 16S, le ribotypage, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE), etc. (3).

Ce travail est rédigé dans le but de donner une idée sur les méthodes d'identification phénotypiques et moléculaires des bactéries lactiques.

Notre travail est constitué de trois chapitres : généralités sur les bactéries lactiques, identification phénotypiques des bactéries lactiques, identification moléculaire des bactéries lactiques.

Chapitre I :
Généralité sur les bactéries
lactiques

I.1 Historique des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très anciennes et sont apparues avant les cyanobactéries, il y a près de 3 milliards d'années (4). Elles ont une longue histoire d'application dans les aliments fermentés, en raison de leurs propriétés métaboliques (5, 6). La première culture pure d'une bactérie a été «*Bacterium lactis*» (probablement *Lactococcus lactis*), isolée par **Joseph Lister en 1873** en utilisant une technique de dilution en série du lait (7). Le terme bactéries lactiques a été utilisé pour signifier «les organismes du lait acidifié » (milk-souring organisms). Selon la taxonomie actuelle, basée sur le séquençage de l'ARNr 16S et d'autres techniques moléculaires, les bactéries lactiques sont regroupées en phylum *Firmicutes* et ordre, *Lactobacillales* (8).

I.2 Description générale des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont ubiquitaire et se trouvent dans différentes niches écologiques (9). Elles sont naturellement associées aux surfaces des muqueuses, en particulier le tractus gastro-intestinal, vaginal et les cavités buccales des humains et des animaux, adhérentes aux végétaux (fruits, légumes et céréales), et dans les aliments vin, produit laitiers et la viande (10, 11).

Lactobacillus kunkeei a été isolée du vin ayant subi une fermentation alcoolique lente (7). Certaines espèces d'enterocoque, comme *Enterococcus mundtii* et *Enterococcus casseliflavus* sont associées aux plantes. Les espèces du genre *Lactococcus* sont couramment présentes dans divers aliments fermentés et dans des matrices végétales et animales, mais pas dans les matières fécales ou le sol. Les *Leuconostocs* se retrouvent couramment dans la matière végétale en décomposition, qui est probablement leur habitat naturel, ainsi que dans la viande, les produits laitiers et divers aliments fermentés (12).

Les bactéries lactiques sont historiquement définies comme une famille hétérogène de microbes qui peuvent fermenter divers nutriments principalement en acide lactique (13). L'hétérogénéité de ce groupe bactérien est bien visible dans leurs traits morphologiques, car ils peuvent apparaître en forme de bâtonnet, cocci, ou coccobacille, en cellules individuelles ou en couple, en tétrades et en chaînes courtes ou longues (14).

En général, ce sont des bactéries à Gram positif, ayant un GC% < 50, non mobiles, asporogènes, aérobie, anaérobie facultatif ou micro-aérophiles, dépourvus de cytochromes par le fait que ces bactéries n'ont pas la capacité de synthétiser des groupes de porphyrine (par exemple, l'hème) par conséquent, elles ne possèdent pas de chaîne de transport d'électrons et dépendent de la fermentation pour générer de l'énergie (15, 16). Elles sont aussi oxydase

négatif, catalase et benzidine négatif, ne réduisent pas les nitrates en nitrite, gélatinases négatives et sont incapables d'utiliser du lactate (15, 17) et aussi elles sont particulièrement tolérantes au sel (18).

Les bactéries lactiques sont chimio-organotrophes et fermentent les glucides en acide lactique presque entièrement (homofermentation) ou en un mélange d'acide lactique, de dioxyde de carbone et d'acide acétique et / ou d'éthanol (hétérofermentation) (Figure 1) (19).

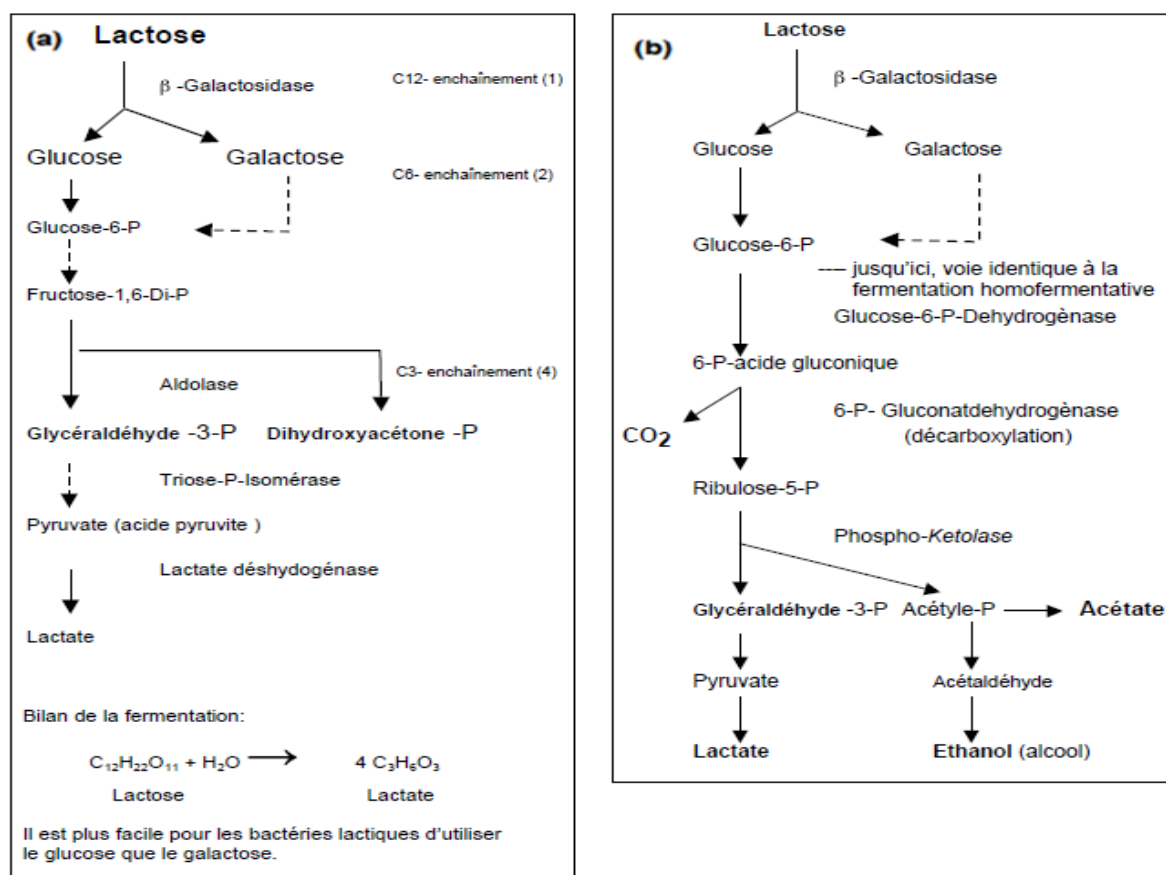


Figure 1 : Les deux voies de la fermentation des bactéries lactiques : (a)Homofermentation, (b) Hétérofermentation (20).

Les bifidobactéries sont également des bactéries lactiques hétérofermentaires qui catabolisent les hexoses par une voie métabolique caractéristique, impliquant la fructose-6 phosphocétolase comme enzyme clé, connue sous le nom de voie du fructose-6-phosphate ou la voie fermentaire des bifides (Figure 2) (21).

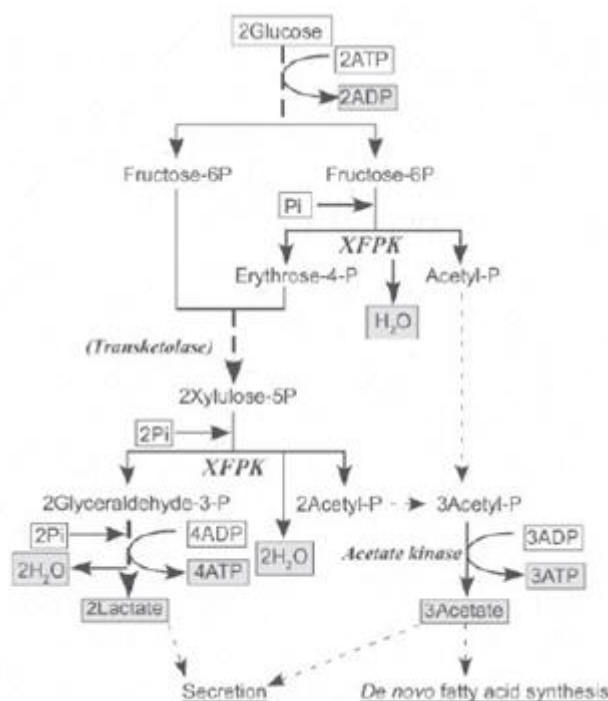


Figure 2 : La voie du fructose-6-phosphate des bifidobactéries (21).

Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont non pathogènes et se voient attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Recognized As Safe) (22). *Lactococcus lactis subsp lactis* et *Lactococcus lactis subsp cremoris* sont utilisés dans la production fromagère (23), *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* dans la production du yaourt et de laits fermentés (laban) (24, 25), *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus plantarum* dans la Production des viande fermentés (26).

Cependant, quelques membres du genre *Streptococcus* (*Streptococcus sanguinis*) et *Enterococcus* (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*) ainsi que d'autres bactéries lactiques comme *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* et *Pediococcus pentosaceus* peuvent aussi être des pathogènes opportunistes (22, 27, 28, 29, 30).

Les bactéries lactiques ont un temps de génération élevé par rapport aux microbes respirant et produisent de plus petites colonies de 2–3 mm. Elles peuvent se développer à des températures comprises entre 5 à 45°C et sont tolérantes aux conditions acides, la plupart des souches pouvant croître à pH 4,4. La croissance optimale est comprise entre pH 5,5–6,5. Ces microorganismes ont des besoins nutritionnels complexes en acides aminés, peptides, bases nucléotidiques, vitamines, minéraux, acides gras et glucides (16). Le séquençage du génome a révélé que la plupart des bactéries lactiques manquent de voies de biosynthèse des acides aminés essentiels, des nucléotides et des vitamines. Grâce à l'analyse génomique, de

Chapitre I : Généralités sur les bactéries lactiques

nombreux systèmes d'absorption des saccharides, de protéolyse et de transporteurs d'acides aminés ont été codés par le génome pour aider l'hôte à absorber les nutriments présent dans l'environnement (31).

Le génome des bactéries lactiques est relativement petit. Il est compris entre 1,7–3,3 Mpb et code pour des protéines allant de 1700 à 3200 Da. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 possède le plus grand génome (3,3 Mpb) qui lui confère la flexibilité de peupler plusieurs niches écologiques (tractus-intestinal, fermentation végétale, eaux usées). Inversement, *Streptococcus thermophilus* CNRZ1066 et LMG18311 ainsi que *Lactobacillus bulgaricus* ATCC11842 présentent de petits génomes (1,8 Mpb) (31). Le nombre de gènes protéiques prédits est à peu près en corrélation avec la taille du génome, car la densité génétique des génomes bactériens est relativement constante, de sorte qu'un génome plus long contient généralement plus de gènes (32). Par exemple, en raison de leurs génomes plus petits, peu de gènes ont été identifiés pour la souche *Oenococcus oeni* PSU-1 (1691 gènes dans un génome de 1,78 Mpb), par contre, un grand nombre de gènes a été identifié dans *Lactobacillus buchneri* ATCC 11577 (3002 gènes dans un génome de 2.86 Mpb) (33).

Une des particularités des génomes des bactéries lactique est la possession de pseudogènes en nombre élevé (10% à 12%) du fait de décalages cadre de lecture, de mutations non-sens ou encore de délétions dans certains gènes. Les cultures de yaourt *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* auraient le plus grand nombre de pseudogènes, 270 et 182, respectivement (34).

La plupart des espèces de bactéries lactiques contiennent plusieurs plasmides qui sont extrêmement variés en termes de taille (0,87 kpb à plus de 250 Kpb), de nombre de copies (de 1 à plus de 100 plasmides par cellule) et de phénotypes conférés à leurs hôtes (35). De nombreux caractères industriels pertinents sont codés sur ces plasmides, notamment le métabolisme du lactose, les enzymes protéolytiques, l'absorption de citrate, la résistance aux bactériophages, la production de bactériocine, la biosynthèse des polysaccharides, la résistance aux ions métalliques et la résistance aux antibiotiques (36). Les plasmides sont fréquents chez *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus salivarius* et d'autres bactéries ne possèdent aucun plasmide tel est le cas de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* (35).

Les bactéries lactiques diffèrent par le nombre d'opérons d'ARNr, de 2 chez *Oenococcus oeni* à 9 chez *Lactobacillus delbrueckii*. Dans de nombreux cas, les gènes codant des ARNt sont localisés au sein d'opérons ribosomiques et le nombre de ces gènes est compris entre 57

et 95. Aussi, tous les génomes des bactéries lactiques contenaient des transposons, allant de 0,2% chez *Lactobacillus gasserii* à près de 5% dans *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* (34).

I.3 Taxonomie des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont été divisées en quatre genres, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*. (37) et plusieurs nouveaux genres ont été ajoutés *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (15).

Les genres des bactéries lactiques, telles que *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*, ont une teneur en GC% inférieure à 50% en moles et appartiennent à la branche Clostridium. Le genre *Bifidobacterium* considéré comme un membre des bactéries lactiques, est maintenant ajouté à la branche des actinobactéries (Figure3), vue la forte teneur de l'ADN en GC% et des données d'ARNr 16S (38).

Dans une importante période de l'histoire de la microbiologie, la classification des bactéries lactiques était largement basée sur des caractéristiques observables telles que leurs propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Ces caractéristiques sont souvent appelées phénotype. En général, les bactéries ayant des propriétés très similaires étaient considérées comme appartenant à la même espèce, et les espèces ayant des propriétés similaires étaient classées comme appartenant au même genre (39).

La détermination des séquences d'ARNr 16S, dans les années 1990, a initié un développement rapide de sondes d'ADN pour l'identification et l'élucidation de la phylogénie des bactéries lactiques (40).

Avec la disponibilité de la technologie de séquençage rapide et automatique de l'ADN, le séquençage direct du gène de l'ARNr 16S est devenu la méthode la plus utilisée pour la classification des bactéries (39).

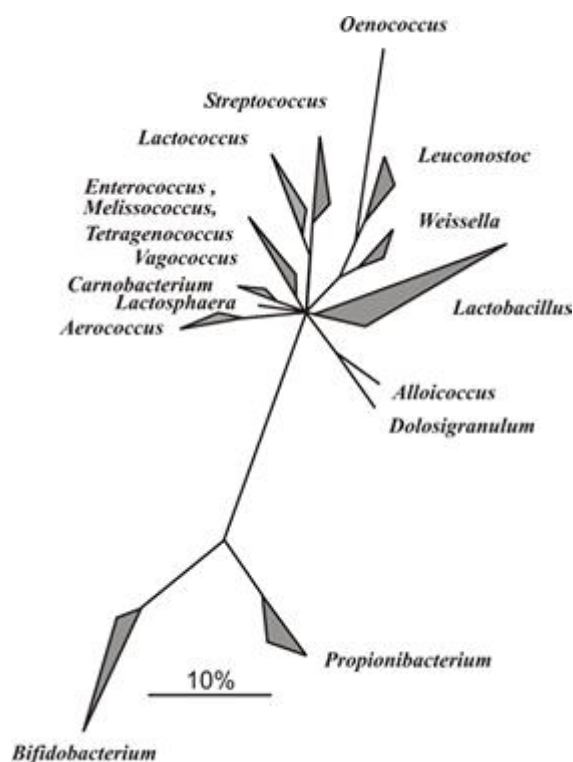


Figure 3 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse comparative de GC% des séquences d'ARNr 16S, montrant le groupe phylogénétique des bactéries lactiques, *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (41).

I.4 Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques:

I.4.1 Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est placé dans la famille des *Streptococcaceae* et dans l'ordre des *Lactobactiales* (42). Ils peuvent se trouver chez les humains, les animaux, et dans des sources environnementales et alimentaires (43). La plupart des espèces de ce genre sont commensaux, parasites et certains sont hautement pathogènes telles que : *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, or *Streptococcus pneumoniae* (38, 44). *Streptococcus thermophilus* est la seule espèce utilisée dans l'industrie alimentaire et à être reconnue comme GRAS par la *Food and Drug Administration* (FDA). Elle est apparentée à *Lactococcus lactis* mais est phylogénétiquement plus proche des espèces streptococciques du groupe viridans (45, 46).

La classification précoce pour *Streptococcus* était principalement basée sur la réaction hémolytique et les antigènes du groupe de Lancefield, qui ont divisé le genre en deux groupes: les *pyogènes* et les *viridans*. Le groupe *pyogène* était bêta-hémolytique et isolé à partir d'une gamme de sources humaines et animales, tandis que le groupe *viridans* était principalement alpha-hémolytique et isolé principalement de la cavité buccale humaine. Par la suite, l'analyse des séquences d'ARNr 16S a permis de diviser le groupe des *viridans* en cinq

sous-groupes dont les noms reflétaient l'une des espèces de chacun des groupes: *anginosus*, *mitis*, *salivarius*, *bovis* et *mutans* (50).

Les streptocoques sont des bactéries Gram-positives, de forme sphérique ou ovoïde, mais certaines espèces peuvent apparaître sous forme de bâtonnets courts dans certaines conditions de culture (44, 48). Elles sont généralement disposées en chaînes ou en paires, la formation de chaînes étant mieux visible dans les cultures en bouillon. Les cellules individuelles ont généralement un diamètre de 0,8 à 1,2 µm et la longueur des chaînes varie de quelques cellules à plus de 50, selon la souche et les conditions de croissance (38).

Elles sont anaérobies facultatifs mais certaines souches nécessitent du CO₂ pour leur croissance, en particulier lors de l'isolement initial. Non sporulant, catalase négative, non mobiles, se développent généralement entre 20 à 42°C, avec 37°C comme température optimale et incapables à se développer à pH 9.6. Ce sont des chimio-organotrophes, homofermentaires et auxotrophe pour certains acides aminés, peptides, purines, pyrimidines et des vitamines. Certaines espèces sont capables de cataboliser l'arginine comme un autre mécanisme énergétique (38).

La majorité des espèces de *Streptococcus* ont des GC% qui varient entre 33 à 46 % (38). Les génomes sont compris entre 1,75 Mpb (*Streptococcus pyogenes*) et 2,21 Mpb (*Streptococcus agalactiae*). Le nombre de gènes codants se situe entre 1697 à 2376, avec une composition génique très variable (49). Aussi, ces microorganismes ont des fractions relativement élevées de pseudogènes (50).

La taille des plasmides varie de 1MDa à 76 MDa selon la taille. Le nombre de copies est généralement élevé (10 à 30) lorsque les plasmides sont de taille inférieurs à 7 MDa et faible (1 à 2) lorsque les plasmides sont plus grands (51).

Streptococcus thermophilus, plus communément utilisée dans le domaine alimentaire, apparaît comme une espèce naturellement pauvre en plasmides et ces plasmides sont toujours de petite taille (quelques kilobases) et cryptique à l'image de la souche *Streptococcus thermophilus* LMG13811 qui contient un génome de taille 1 796 846 pb et code 1890 protéines, 67 ARNt, 6 ARNr et 180 pseudogènes mais ne contient aucun plasmide (1).

I.4.2 Le genre *Lactococcus*

Comme les streptocoques, les lactocoques appartiennent à la famille des *Streptococaceae*. Les espèces les plus importantes sont *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et *Lactococcus garvieae* (20).

Les cellules de *Lactococcus* sont des sphères ovoïdes, isolées, en paires ou en chaînes, souvent allongées en direction de la chaîne, à Gram positif, anaérobies, ne possèdent ni cycle

d'acide citrique ni de chaîne respiratoire mais aérotolérants par la possession de superoxyde dismutase ou de NADH oxydases, non mobile, catalase négative, qui peuvent croître à 10 ° C mais pas à 45 ° C. ils poussent habituellement dans 4% de NaCl à l'exception de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* qui ne tolère que 2% de NaCl et produisent de l'acide lactique à partir du glucose, du fructose, du mannose et du N-acétyl glucosamine (38).

Les lactocoques possèdent un GC% qui varie de 34 à 43% par moles d'ADN et un nombre total de gènes de 2300 (38, 52). Les données de séquençage du génome ont confirmé la présence de six opérons d'ARNr, 62 gènes d'ARNt organisés en quatre grands opérons et 1495 gènes codant pour des protéines (52).

Les génomes des souches de *Lactococcus lactis* varient de 2,3 à 2,6 Mpb et codent pour 2300 à 2500 protéines. *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* a un génome de taille 2,53 Mpb, codant pour 2434 protéines et 81 gènes non traduits (33). Les souches de *Lactococcus lactis* contiennent de nombreux plasmides, 4 à 7 généralement, dont la taille varie de 0,87 Kpb à plus de 80 Kpb (35).

I.4.3 Le genre *Enterococcus*

Fait partie de la famille des *Streptococaceae*, sous-groupes des streptocoques fécaux selon la classification de Sherman en 1937. Les entérocoques sont généralement isolés du tube digestif des humains et d'autres sources environnementales et animales sous forme de cellules ovoïdes, allongées dans le sens de la chaîne, isolées en paires ou en courtes chaînes (38, 53).

Elles sont des bactéries anaérobies facultatives Gram positif, catalase négative, non sporulées, à métabolisme homofermentaire produisant l'acide lactique L(+) à partir du glucose. Ils sont capables de survivre dans certaines conditions extrêmes de température (5–65°C), de pH (4,5-10) et de concentration élevée de NaCl (54).

Les entérocoques ont une teneur génomique faible en GC% de 34 à 45%. Leur chromosome est un ADN circulaire unique d'une taille allant de 2,3 à 5,4 Mpb contenant 2154 à 5107 gènes (55), dont 3182 gènes codent pour les protéines, 12 codent des ARNr et 68 codent des ARNt (52).

I.4.4 Le genre *Pediococcus*

Les *Pediococcus* se présentent comme des coques à Gram positif sphériques ou lenticulaires, asporulés, immobiles, catalase le plus souvent négative, à fermentation hétérolactique, anaérobies facultatifs, exigeants du point de vue nutritionnel et le GC % varie de 34% à 44%. Ils sont généralement isolés du matériel végétal (*Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus inopinatus* et *Pediococcus lolii*), des boissons fermentées, de la viande et des produits laitiers (38, 56, 57).

Ce genre se compose de 12 espèces, certaines se distinguent par leur capacité à se développer dans un milieu contenant des teneurs très élevées, jusqu'à 18% de NaCl, comme *Pediococcus halophilus* (56, 57).

L'étude phylogénétique de *Pediococcus* est basée sur l'analyse des séquences d'ARNr 16S, elle a permis de classer toutes les espèces du genre *Pediococcus* sauf *Pediococcus dextrinicus* qui est déclassé dans le groupe *Lactobacillus casei* (59).

I.4.5 Le genre *Lactobacillus*

Constitue le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, il regroupe plus de 145 espèces dont la majorité sont liées à l'homme ou utilisées pour la fermentation industrielle des produits laitiers et autres produits alimentaires (60, 61).

Ils peuvent être isolés du tractus gastro-intestinal (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, etc.), des plantes (*Lactobacillus plantarum*, etc.), de la viande (*Lactobacillus brevis*, etc.) et les produits laitiers (*Lactobacillus bulgaricus* et *Lactobacillus casei*) (62).

Les cellules se présentent sous la forme de bâtonnets longs et fins, ou très courts, incurvés et même ovoïdes et souvent en chaînette, non sporulées et généralement non mobiles. La température et le pH de croissance optimaux sont généralement de 30 °C à 40 °C et de 5,5 à 6,2, respectivement. Elles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (61, 63).

La taille du génome des lactobacilles varie entre 1.8 et 3.3 Mpb. *Lactobacillus salivarius* subsp *salivarius* a le génome le plus petit avec 1.8 Mpb codant pour 1562 protéines, 73 gènes non traduits, 3 plasmides et 78 gènes d'ARNt. *Lactobacillus plantarum* a le génome le plus grand avec 3.3 Mpb et code pour 3052 protéines, 39 gènes non traduits, 3 plasmides et 62 gènes d'ARNt (58).

En fonction de la température de croissance, des caractères morphologiques et de la fermentation des hexoses (homofermentaire et hétérofermentaire), Orla Jensen (1919) a proposé de diviser le genre *Lactobacillus* en trois groupes (61).

Groupe 1 : *Thermobacterium*

Regroupe les espèces homofermentaires strictes (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, etc.) qui utilisent la voie d'Embden-Meyerhof pour convertir une molécule d'hexose en deux molécules de lactate. Ces bactéries possèdent une aldolase qui convertit le fructose-1,6 diphosphate en deux molécules de triose-3 phosphate. Elles sont incapables de fermenter les pentoses et les gluconate (manque de phosphocétolase).

Certaines de ces espèces sont d'une grande importance pour le fromage, le yaourt et les boissons probiotiques.

Groupe 2 : *Streptobacterium*

Regroupe les espèces hétérofermentaires facultativement (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, etc.) qui métabolisent les hexoses par la voie glycolytique Embden Meyerhof. Ces bactéries possèdent à la fois l'aldolase et de la phosphocétolase et par conséquent, fermentent non seulement l'hexose mais aussi les pentoses (et souvent le gluconate). En présence de glucose, les enzymes de la voie des phosphogluconates sont réprimées. Plusieurs espèces sont traditionnellement associées aux aliments fermentés et à l'ensilage.

Groupe 3 : *Betabactruim*

Regroupe les lactobacilles hétérofermentaires stricts (*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, etc.), ainsi les hexoses sont fermentés par la voie du phosphogluconate produisant du lactate, de l'éthanol (acide acétique) et du CO₂ en quantités équimolaires. Les pentoses peuvent entrer dans cette voie et être fermentés. Elles se trouvent dans le tractus gastro-intestinal et sont associées à une gamme de denrées alimentaires, notamment le fromage affiné (39, 41, 61, 62).

Depuis le développement des techniques moléculaires, le genre *Lactobacillus* a été révisé une nouvelle fois à travers l'analyse et la comparaison des séquences d'ARNr 16S ainsi trois grands groupes phylogénétique ont été constitués (63).

❖ Le groupe *Lactobacillus delbrueckii* : le plus homogène et contient des espèces homofermentaires strictes correspondant au groupe des *Thermobacterium* décrit par **Orla-Jensen**.

❖ Le groupe *Lactobacillus casei*, *Pediococcus* : est particulièrement hétérogène, la majorité des espèces sont hétérofermentaires strictes ou facultatives (*Lactobacillus casei*, *Pediococcus acidilactici*,) et quelques espèces homofermentaires strictes (*Lactobacillus ruminis*, *Pediococcus damnosus*). La présence de pédiocoques dans ce groupe illustre que la morphologie cellulaire n'est pas un indicateur fiable de parenté.

❖ Le groupe *Leuconostoc paramesenteroides* renommé ultérieurement *Weissella paramesenteroides*. Certaines espèces de *Lactobacillus* sont phylogéniquement plus proches de *Leuconostoc* que d'autres lactobacilles. Ce groupe contient des espèces hétérofermentaires obligatoires (40, 63).

I.4.6 Le genre *Bifidobacterium*

Les espèces bifidobactériennes forment un groupe phylogénétique cohérent montrant plus de 93% de similitude des séquences d'ARNr 16S (64). C'est un membre de la famille des

Chapitre I : Généralités sur les bactéries lactiques

Bifidobacteriaceae et de l'ordre des *Bifidobacteriales*, appartenant au phylum des *Actinobactéries*, représentant l'une des plus grandes unités taxonomiques bactériennes (65).

Les bifidobactéries sont utilisés dans le domaine alimentaire pour leurs effets probiotiques. Elles sont rencontrées dans différentes niches écologiques ; intestin des animaux (humains, vache, lapin, souris, poulet et insectes), la cavité buccale, les eaux usées, le sang et la nourriture (65).

Ce sont des Gram positif, non mobiles, non sporulées, catalase-négatives sauf pour *Bifidobacterium asteroides* et *Bifidobacterium indicum*, anaérobies obligatoires ou facultatifs (66, 67). Les cellules sont des bâtonnets pléomorphes, irréguliers, souvent en forme de Y ou V (68).

La température optimale des souches humaines se situe entre 36°C et 38°C et pour les espèces d'origine animale, elle est légèrement élevée (41–43°C) et peut même atteindre 49,5°C. Le pH optimum de croissance se situe entre 6,0 et 7,0. Elles catabolisent exclusivement les hexoses par une voie des bifide, impliquant la fructose-6 phosphocétolase comme enzyme clé (66).

Les génomes des bifidobactéries varient de 1,73 (*Bifidobacterium indicum*) à 3,25 Mpb (*Bifidobacterium biavatii*), correspondant respectivement à 1352 et 2557 de protéines présumées et possèdent un grand nombre de molécules d'ARNt (de 54 à 58). Le GC% de ces germes est élevé et varie de 52,8% à 65,8% (63). Le nombre moyen des gènes uniques trouvés dans l'ensemble de données génomiques de *Bifidobacterium* est de 249 (69).

Le nombre de locus d'ARNr trouvé chez ces bactéries varie de 2 à 5, et il est plus variable que le nombre de locus d'ARNr identifiés dans d'autres bactéries intestinales humaines telles que les lactobacilles (65).

Seulement 20% des isolats de ce genre contiennent des plasmides à l'image de (*Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*) et plus de la moitié des plasmides séquencés ont été isolés à partir de *Bifidobacterium longum subsp longum*. La plupart de ces plasmides sont des plasmides circulaires d'une taille variable de 1,847 à 10,22 Kpb (70).

En règle générale, lorsque des plasmides sont trouvés, un seul plasmide par isolat est présent, à quelques exceptions près chez *Bifidobacterium kashiwanohense* JCM 15439 et *Bifidobacterium longum subsp longum* DJO10A, qui abritent chacun deux de ces éléments génétiques. De plus, *Bifidobacterium longum* NAL8 et *Bifidobacterium longum* FI10564 contenaient chacun trois plasmides différents (71).

Chapitre I : Généralités sur les bactéries lactiques

Bifidobacterium adolescentis ATCC 15703 possède un génome de taille 2 089 645 bp codant 1631 protéines, 54 de ARNt, 5 de ARNr, mais, elle ne contient ni de plasmide, ni de pseudogène (51). *Bifidobacterium bifidum* BGN4 contient un chromosome circulaire de 2223 664 pb, sans plasmide, mais avec 7 pseudogènes, 3 ARNr et 52 ARNt (72).

Chapitre II :
Identification phénotypique
des bactéries lactiques

II.1. Historique d'identification phénotypique

Les bactéries lactiques comprennent un large éventail de genres ayant un nombre considérable d'espèces (73). Elles se trouvent sur les plantes, dans les eaux usées, dans les voies génitales, intestinales et respiratoires de l'homme et des animaux, et dans les aliments et boissons fermentés. (19) En raison du rôle important des bactéries lactiques, l'identification de ces microorganismes est d'un grand intérêt scientifique et pratique (74).

C'est **Orla-Jensen en 1919** qui a lancé l'un des premiers schémas de classification utile pour les bactéries lactiques, qui était principalement basé sur la morphologie, l'écologie et les propriétés physiologiques, notamment les températures de croissance optimales. A cette époque, les bactéries lactiques étaient classées en trois taxons: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium* (75).

Diverses révisions et améliorations ont été apportées à l'identification phénotypique des bactéries lactiques, y compris des données biochimique et chimiotaxonomiques supplémentaires (76).

En raison des incertitudes soulevées par la variabilité et l'instabilité de certains caractères phénotypiques et la dépendance des conditions de culture, l'utilité taxonomique de cette identification est limitée par une perte de discrimination d'organismes étroitement apparentés (75).

II.2. définition du terme identification phénotypique

L'identification phénotypique est considérée actuellement comme une procédure conventionnelle pour l'identification de routine des bactéries (77). Elle se base sur l'étude des propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques, comme par exemple : La forme des cellules, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, la configuration de l'acide lactique, la fermentation de divers glucides, les esters méthyliques d'acides gras et la configuration des protéines dans la paroi cellulaire ou dans la cellule entière. Dans l'identification phénotypique des bactéries lactiques comme toute autre bactérie, figure l'aspect morphologique, physiologique et biochimique (78).

II.2.1. Aspect morphologique

La morphologie des bactéries comprend à la fois la morphologie des colonies (couleur, taille, forme et texture) et la morphologie cellulaire comme la forme des cellules (coque, bacille et coccobacille), la présence d'endospores, de flagelles, d'organites et d'inclusions et elles sont souvent révélées par des colorations simples à l'état frais ou par des colorations différentielles comme la coloration de Gram (79).

Chapitre II : Identification phénotypique des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont constituées d'un groupe hétérogène de bactéries Gram-positives. Dans lequel on distingue deux grands groupes morphologiques: les coques et les bacilles (**Tableau 1**) (80).

Tableau 1 : La forme des cellules des différents genres des bactéries lactiques (52).

Genre	Forme
<i>Streptococcus</i>	Cocci
<i>Bifidobacterium</i>	Bacille
<i>Lactobacillus</i>	Bacille
<i>Pediococcus</i>	Cocci
<i>Entérocooccus</i>	Cocci
<i>Lactococcus</i>	Cocci

II.2.2. Aspect physiologique

L'aspect physiologique inclue principalement la croissance bactérienne à différents pH et températures (T°), le métabolisme des glucides, la dégradation d'esculine, la résistance à différentes concentrations de sel (NaCl), etc. L'identification des bactéries lactiques par cette méthode consiste à comparer les caractéristiques des bactéries non identifiées aux caractéristiques physiologiques de différentes espèces (**Tableau 2**) (76).

Tableau 2 : Les caractéristiques physiologiques de certaines espèces des bactéries lactiques (52)

Espec	Type de fermentation	Température optimale	pH optimum	Hydrolyse de l'esculine
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	Homofermentaire obligatoire	45°C - 48°C	5 – 5.5	Dans certains cas
<i>Oenococcus oeni</i>	Hétérofermentaire	22°C	4.8	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Hétérofermentaire	20°C - 30°C	6 – 7	+
<i>Leuconostoc oenos</i>	Hétérofermentaire	20°C – 30°C	4.2 – 4.8	-

II.2.3. Aspect biochimique

L'aspect biochimique est un examen qui permet d'identifier une bactérie en s'appuyant sur ses caractères biochimiques, telle que : l'analyse de la composition de la paroi cellulaire, le profil des

acides gras de la membrane et l'analyse des protéines de la cellule entière, etc. Cette caractérisation extensive de la biochimie est d'une grande valeur dans la pratique et l'application des bactéries lactiques (75).

II.2.3.1. Identification par la composition de la paroi cellulaire

Loin d'être une structure statique et rigide, la paroi cellulaire est très dynamique et impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires essentielles. En tant que bactéries à Gram positif, les bactéries lactiques sont enfermées dans une dense paroi cellulaire caractérisée par une épaisse couche de peptidoglycane lié à d'autres polymères, tels que les acides téichoïques, les polysaccharides, et des protéines (Figure 4) (81).

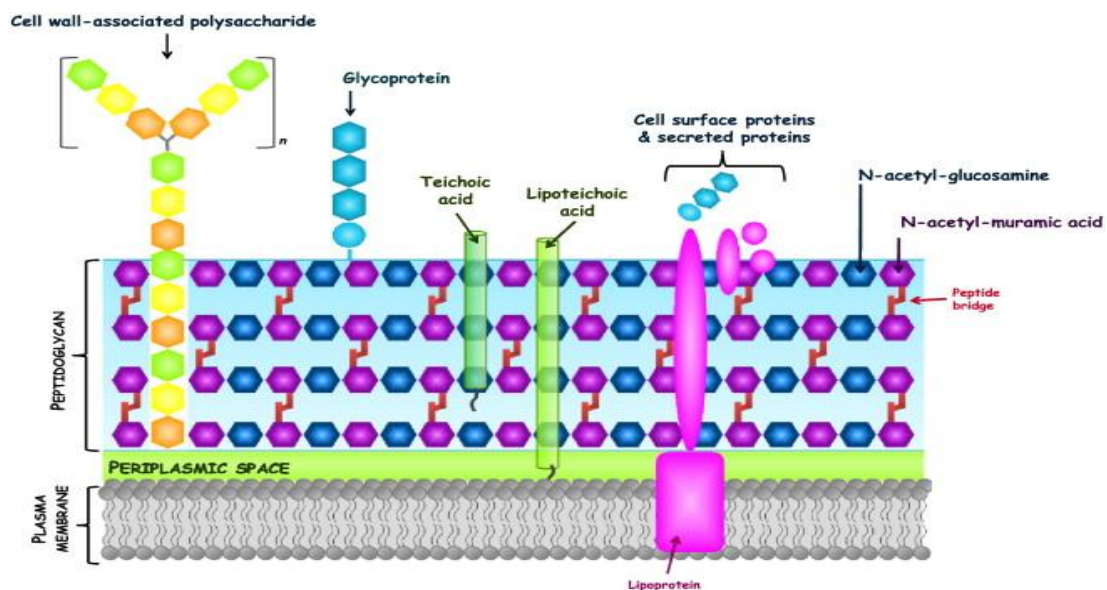


Figure 4: La paroi cellulaire des bactéries lactiques (82).

➤ Peptidoglycane des bactéries lactiques

Le peptidoglycane est une macromolécule complexe constituée de chaînes linéaires polysaccharidiques réticulées par de courtes chaînes peptidiques.

Les chaînes polysaccharidiques sont composées d'une alternance de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc) qui sont liés par des liaisons β (1-4), qui peut être coupé par le lysozyme. En effet, sur le groupement carboxyle de chaque acide muramique se fixe un peptide qui se réticule à un autre peptide d'une chaîne glycane en vis-à-vis permettant ainsi de former un réseau.

Les peptides sont constitués d'une alternance d'acides aminés D et L qui varient selon les espèces bactériennes à certaines positions. Le plus souvent, on trouve le L-Lys dans *Lactococcus lactis* et dans la plupart des lactobacilles, l'acide méso-diaminopimélique dans *Lactobacillus plantarum* ou la L-ornithine dans *Lactobacillus fermentum* (81, 83).

Chapitre II : Identification phénotypique des bactéries lactiques

La réticulation des peptides des chaînes du peptidoglycane est établie par une liaison amide le plus souvent entre D-Ala en position 4 d'une chaîne et le groupe amino libre du di-acide aminé en position 3 d'une autre chaîne (84).

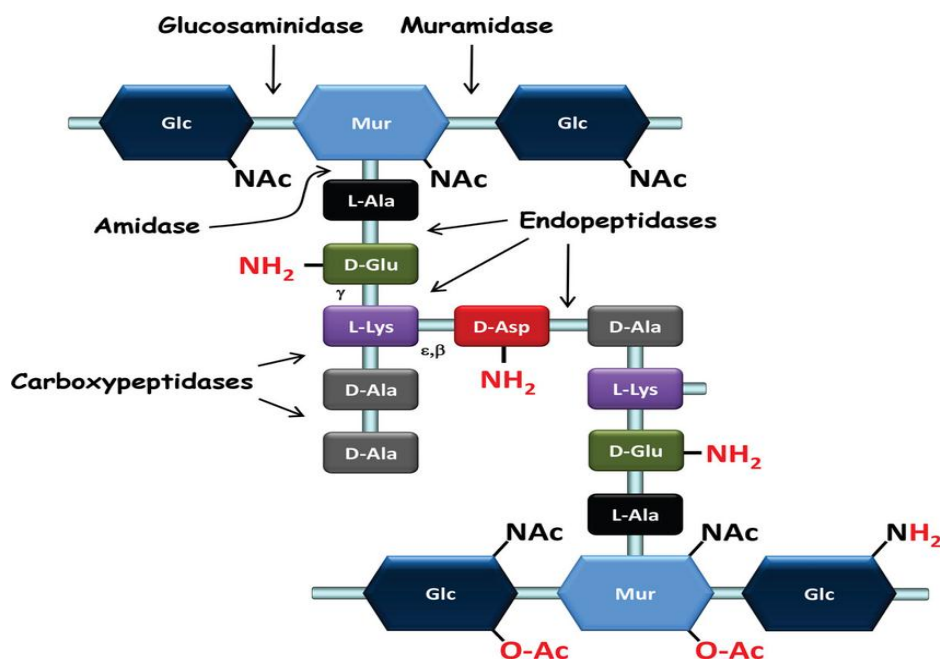


Figure 5 : Représentation schématique de la structure du peptidoglycane *Lactococcus lactis* (84).

La réticulation des peptides peut être soit direct entre les deux chaînes peptidiques (par exemple dans *Lactobacillus plantarum*) soit à travers de courts ponts inter-peptidiques qui varie considérablement dans la composition et la séquence des acides aminés, par exemple on peut trouver D-Asp ou D-Asn dans *Lactococcus lactis* et plusieurs lactobacilles et L-Ala₂ ou L-Ala₃ chez *Streptococcus thermophilus* (83, 84).

Les parois cellulaires des bactéries lactiques contiennent divers types de peptidoglycanes, qui diffèrent par la séquence d'acides aminés du fragment peptidique et le type de réticulation. Le **Tableau 3** présente quelque type de peptidoglycane des bactéries lactiques (32, 52).

Tableau 3 : Certain types de peptidoglycane dans les bactéries lactiques (32, 52).

Type de peptidoglycane	Espèces bactériennes
Le type Meso-DAP-direct	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Le type Lys- D-Asp	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Pediococcus dextrinicus</i>
Le type Lys–Ala ₂₋₃	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Le type Lys-Ser-Ala ₂	<i>Lactobacillus rossiae</i>
Le type Orn–dAsp	<i>Lactobacillus fermentum</i>

Chapitre II : Identification phénotypique des bactéries lactiques

En plus des différences citées, une variation structurale de la molécule du peptidoglycane peut également être rencontrée au sein d'un espèce de bactérie lactique donnée. Ces modifications secondaires se retrouvent sur les chaînes glucidiques comme l'O-acétylation (retrouvée dans tous les bactéries lactiques étudiées) et la N-désacétylation de MurNAc ou / et GlcNAc (chez *Lactococcus lactis*). Aussi d'autres modifications sur les chaînes peptidiques telles que l'amidation du groupe carboxyle de D-Glu et Meso-DAP sont observées dans *Lactobacillus plantarum*, et l'amidation de D-Asp chez *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus casei* (83).

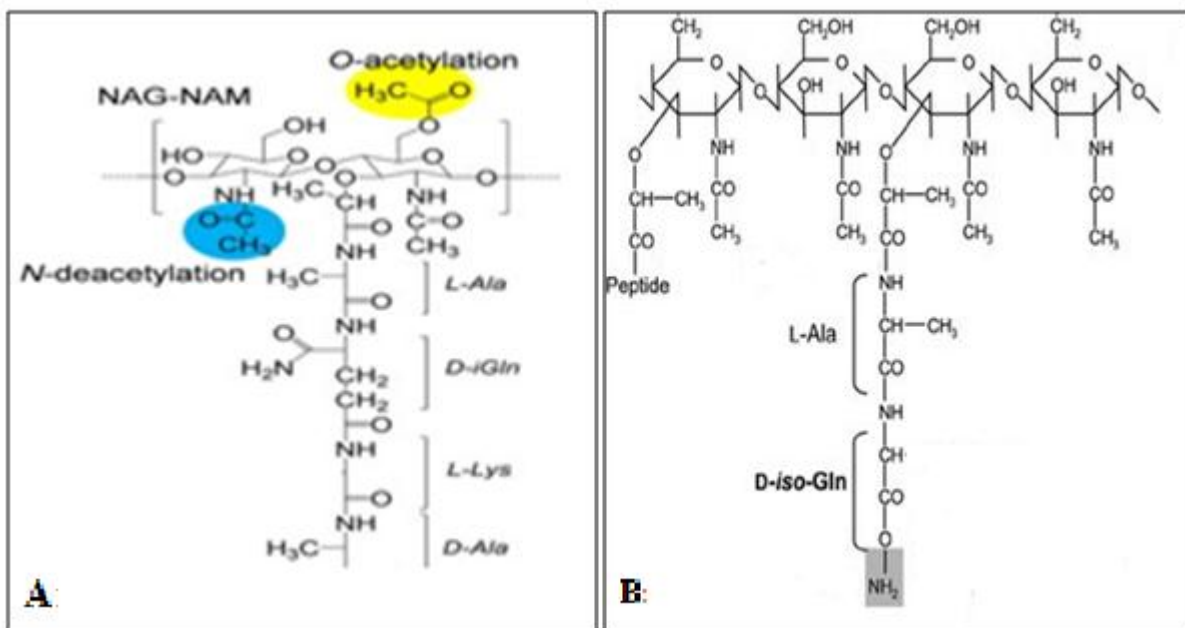


Figure 6: Les modifications secondaires du peptidoglycane (86 ,85).

➤ L'acide teichoïque des bactéries lactiques

Chez certaines espèces, les acides téichoïques peuvent constituer jusqu'à la moitié du poids sec total de la paroi bactérienne. Ce sont des polymères anioniques constitués d'unités répétitives de phosphate d'alditol et sont classés en deux groupes: les acides téichoïques muraux et les acides lipotéichoïques (87).

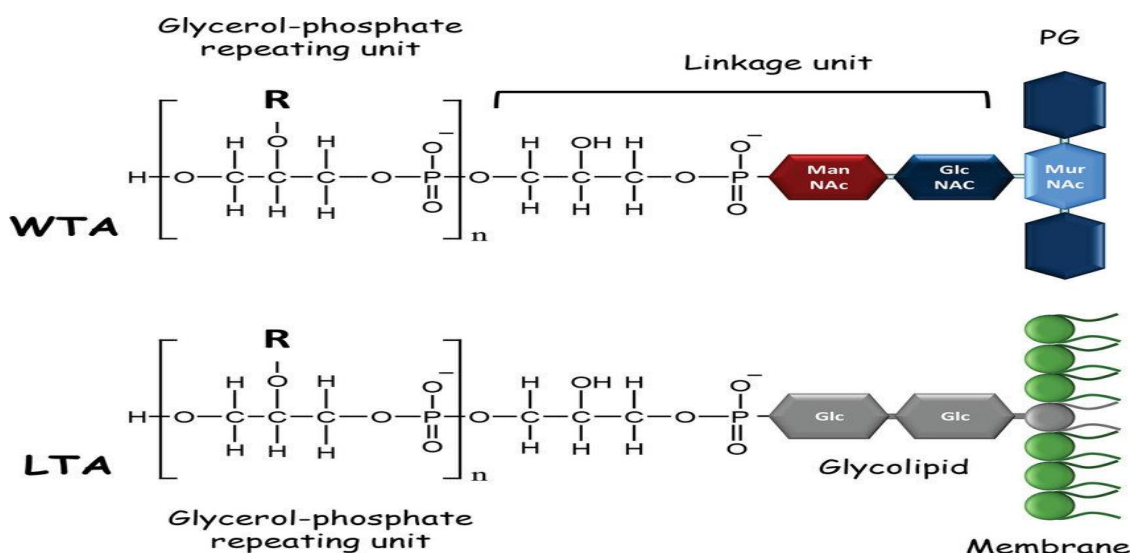


Figure 7 : Représentation schématique de la structure de l'acide teichoïque et de l'acide lipotéichoïque (84).

Les acides téichoïques muraux présentent des structures variables entre les espèces bactériennes. Ils contiennent généralement des alditoles principalement du glycérol (Gro) ou du ribitol (Rbo), et du phosphate. Ils sont liés de manière covalente au peptidoglycane par une liaison phosphodiester au C6-hydroxyle de MurNAc, par une liaison généralement constituée d'un disaccharide, la N-acétylmannosaminyl- β (1-4) -N-acétylglucosamine, et une unité Gro-P (81, 88).

La structure de l'acides lipotéichoïques typique consiste en une chaîne poly (Gro-P) liée de manière covalente aux résidus hexose des glycolipides de la membrane cellulaire par une liaison 1,3-polyglycérol-phosphate et forme un diglucosyl-diacyl-glycérol. Les groupes hydroxyle libres sur les unités Gro ou Rbo-alditol sont partiellement liés au D-Ala ou un monosaccharide, tel que Glc, Gal ou GlcNAc (81, 89).

Alors que les acides lipotéichoïques sont présents dans toutes les bactéries lactiques, les acides teichoïques muraux semblent être absents de certains lactobacilles tels que *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus rhamnosus* (81).

Les acides téichoïques muraux les plus étudiés étant un squelette poly (Gro-P) et poly (Rbo-P). Une souche donnée est capable de synthétiser un seul type d'acides teichoïques murale, bien que certaines souches aient le potentiel génétique de synthétiser les deux types d'acides teichoïques muraux (83). C'est le cas notamment de *Lactobacillus plantarum* qui s'est avéré être l'unique espèce des bactéries lactiques où l'on trouve les deux types (90).

Deux types de modifications peuvent se produire sur les chaînes d'acide téichoïque: La première est la D-alanylation, bien connue et résulte de l'estérification des groupes alditol des chaînes d'acides teichoïques avec D-Ala. Le second type de modification est représenté par l'addition de substituant de sucre sur les groupements hydroxyles libres de Gro ou Rbo des chaînes acides

Chapitre II : Identification phénotypique des bactéries lactiques

teichoïques. En ce qui concerne la structure des acides lipotéichoïques, D-Ala a été trouvé comme le seul substituant détectable chez *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus rhamnosus*. Tandis que chez *Lactococcus lactis*, le galactose (Gal) est également trouvé en plus de D-Ala (83).

Plusieurs chercheurs ont utilisé la technique HPLC ou UPLC pour l'identification des bactéries lactiques par l'analyse de la composition de la paroi cellulaire comme peptidoglycane et l'acide teichoïque (81).

Après la lyse des cellules, dans un tampon incluent le SDS, on effectue la purification des composante de la paroi par dégradation des protéines associées au peptidoglycane ; la digestion en sous-unités disaccharidiques d'un muropeptide avec la muramidase (mutanolysin) ; la réduction des sucres avec du borohydrure de sodium de sorte que chaque fragment élue comme un seul pic ; le réglage du pH au point isoélectrique des muropeptides et en fin un filtration avant injection de l'échantillon dans l'HPLC (90, 91).

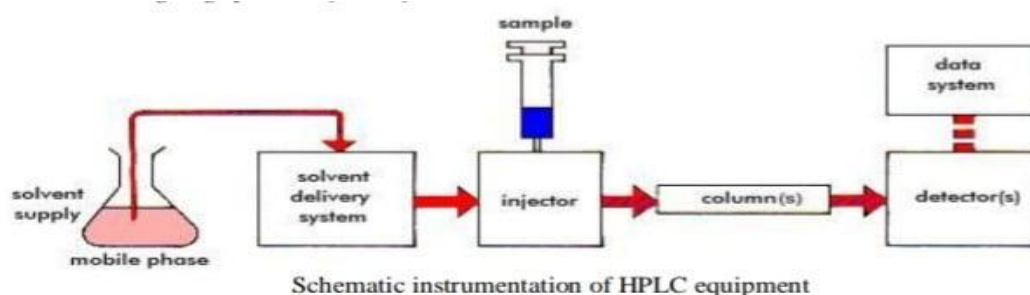


Figure 8: Instrumentation schématique des équipements d'HPLC (92).

L'analyse de peptidoglycane par l'HPLC se fait par la détection et l'identification des muropeptides (Figure 9) (90) par des colonnes C18 en phase inverse, fortement hydrophobe, traversés par une phase mobiles tamponnées au phosphate de sodium / méthanol pour séparer les différentes espèces de muropeptides et une détection avec l'UV à 202–208 nm sont utilisées (91, 93).

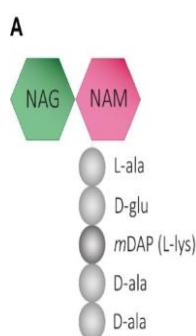


Figure 9 : La structure d'un muropeptide (91).

Les identités de Muropeptide peuvent être déterminées soit en collectant le volume élué d'un pic individuel et en le soumettant à la spectrométrie de masse, soit simplement par comparaison avec des études précédentes basées sur le temps d'éluion du pic (91, 89).

L'analyse de l'acides teichoïques par l'HPLC se fait après une hydrolyse des liaisons phosphodiester par l'hydroxyde de sodium et un fractionnement sur une fine colonne Sephadex G-25. Les fractions résultantes sont collectées et soumises à l'HPLC pour analyser la composition du sucre-phosphaté des acides teichoïques de la paroi bactérienne (Figure 10) (94). Ainsi cette identification se fait par la comparaison des résultats obtenus avec ceux de références bien établies (91).

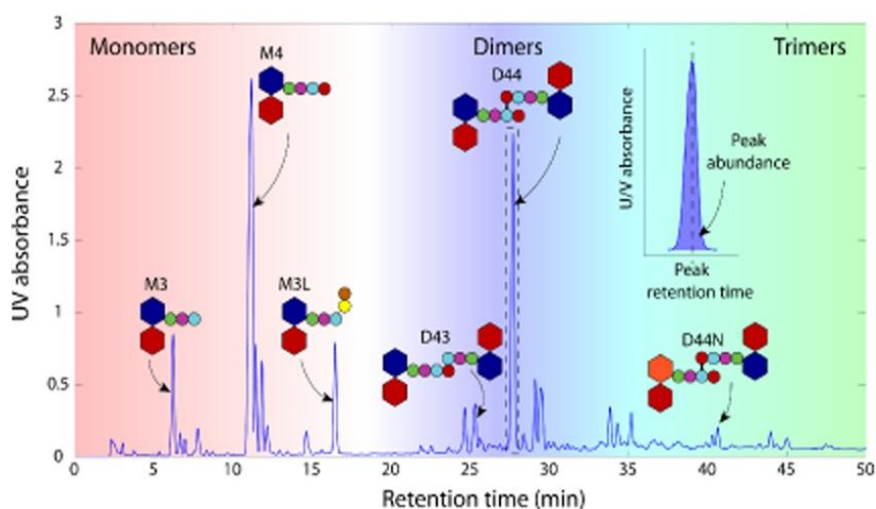


Figure 10 : Exemple d'une analyse HPLC de peptidoglycane (91).

II.2.3.2. Identification par le profil des acides gras

Les acides gras sont de petites molécules organiques principalement présents dans la membrane cellulaire. Ils jouent des rôles importants dans les activités physiologiques et aident également à distinguer et à identifier les microorganismes en fonction de leur composition (95), et ce en comparant les profils des esters méthyliques d'acides gras (FAME) d'une bactérie donnée à ceux de références (96).

Vandamme *et al.*, (1996), ont confirmé la possibilité d'utiliser le profil des acides gras (%) comme un outil chimiotaxonomique d'appoint aux données de méthodes phénotypiques pour l'identification des bactéries (97), car chaque souche bactérienne a un profil d'acides gras spécifique. Ainsi des esters méthyliques d'acide gras (FAME) ont été utilisés pour l'identification des isolats des bactéries lactiques (Tableau 4) (82, 98).

Tableau 4 : Les profils des acides gras de certaines espèces de bactéries lactiques (52, 99, 100, 101)

Espèces	<i>Tetragenococcus koreensis</i>	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Acides gras	trans-9-octadécénoïque	Tétradécanoïque	Dodécanoïque
	Tétradécanoïque	Hexadécanoïque	Tétradécanoïque
	Hexadécanoïque	Hexadécénoïque	cis-9-tétradécénoïque
	trans-6-octadécénoïque	Octadécanoïque	cis-9-hexadécénoïque
	cis-9-hexadécénoïque	Octadécénoïque	Octadécanoïque
	cis-11-octadécénoïque	Octadécadiénoïque	Octadécénoïque
	/	/	Octadécénique

L'analyse des acides gras membranaire se fait par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (**Figure 8**) après séparation des acides gras des lipides des bactéries, méthylation pour former FAMES et extraction par un solvant organique (**102**).

Les pics donnés par la CPG sont automatiquement intégrés dans des systèmes d'analyse (Exemple : *Sherlock Microbial Identification System, MIS*) qui donne la distribution des acides gras en pourcentage des acides gras totaux (**98, 103**).

L'identification des bactéries lactiques par cette méthode se fait par fait par comparaison du profil obtenu à ceux d'une base de données réalisée à partir d'isolats d'origines connues (**96**).

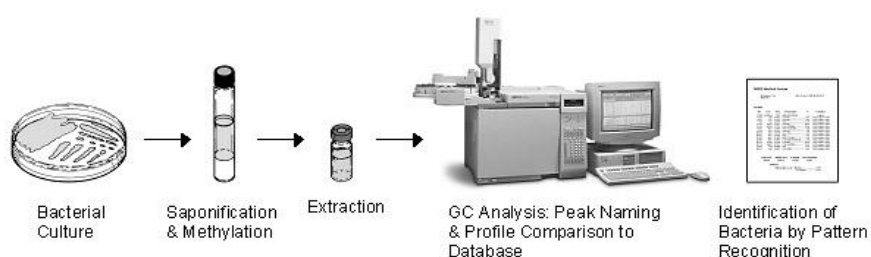


Figure 11 : Schéma du système d'identification microbienne Sherlock (**103**).

La détermination de type de peptidoglycane de la paroi cellulaire, la composition des acides teichoïques, et les esters méthyliques d'acides gras (FAME) et aussi l'analyse des antigènes de Landefeld, la détermination de la mobilité électrophorétique des déshydrogénases de l'acide lactique ont été toutes utilisées comme approches phénotypiques à la taxonomie de certaines bactéries

lactiques. Vu que ces techniques sont laborieuses et encombrantes, elles ne sont plus utilisées aujourd'hui (32).

D'autres techniques sont avérées particulièrement utiles à l'identification précise au niveau des espèces des bactéries lactiques, c'est le cas notamment de l'analyse des protéines de cellules entières par électrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécyl sulfate de sodium SDS PAGE, la spectrométrie de masse par désorption laser assistée par matrice / ionisation-temps de vol (MALDI-TOF MS) et par spectroscopie infrarouge transformée de Fourier FTIR (32).

II.2.3.3. Identification par l'analyse des protéines

Les protéines sont des molécules biologiques aux activités très variées, elles peuvent assurer des fonctions diverses au sein de la cellule (la structure, le métabolisme, etc.) et peuvent aussi être utilisées dans l'identification des espèces bactériennes y compris les bactéries lactiques par l'analyse des profils spécifiques de protéines de chaque espèce (104).

➤ SDS-PAGE (Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et au sodium dodécyl sulfate)

C'est une technique de séparation des particules en fonction de leur charge électrique, de leur taille et dans des conditions dénaturantes (SDS est un détergent fort qui confère une charge nette négative aux protéines) (37).

Elle consiste en l'extraction des protéines cellulaires totales que l'on fait ensuite migrer sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. On obtient ainsi un profil caractéristique de la souche bactérienne qui reflète le bagage génétique du microorganisme, et sa comparaison avec les profils d'autres bactéries permettra de mesurer le degré de parenté. Ainsi deux microorganismes différents auront deux profils électrophorétiques différents et deux microorganismes très proches doivent avoir des profils électrophorétiques similaires ou identiques (104).

Cette méthode a été utilisée avec succès pour identifier les bactéries lactiques isolées des vins, des moûts et des fromages italiens au lait de brebis. Cette méthode a également été utilisée pour résoudre des problèmes de différenciation d'espèces étroitement apparentées dans les genres *Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Lactococcus* (105).

Après coloration directe et révélation des protéines sous forme de bandes, le gel est scanné (106) puis analysé (37) en se basant sur le nombre de bande, leurs positions et leurs intensités par appariement (automatiquement, manuellement ou avec une combinaison d'appariement automatique suivi d'une intervention de l'opérateur) à un ensemble de bandes qui sont supposés être représentatifs de l'ensemble des espèces bactériennes modèles par l'analyse de cluster hiérarchique (Figure 12) (107).

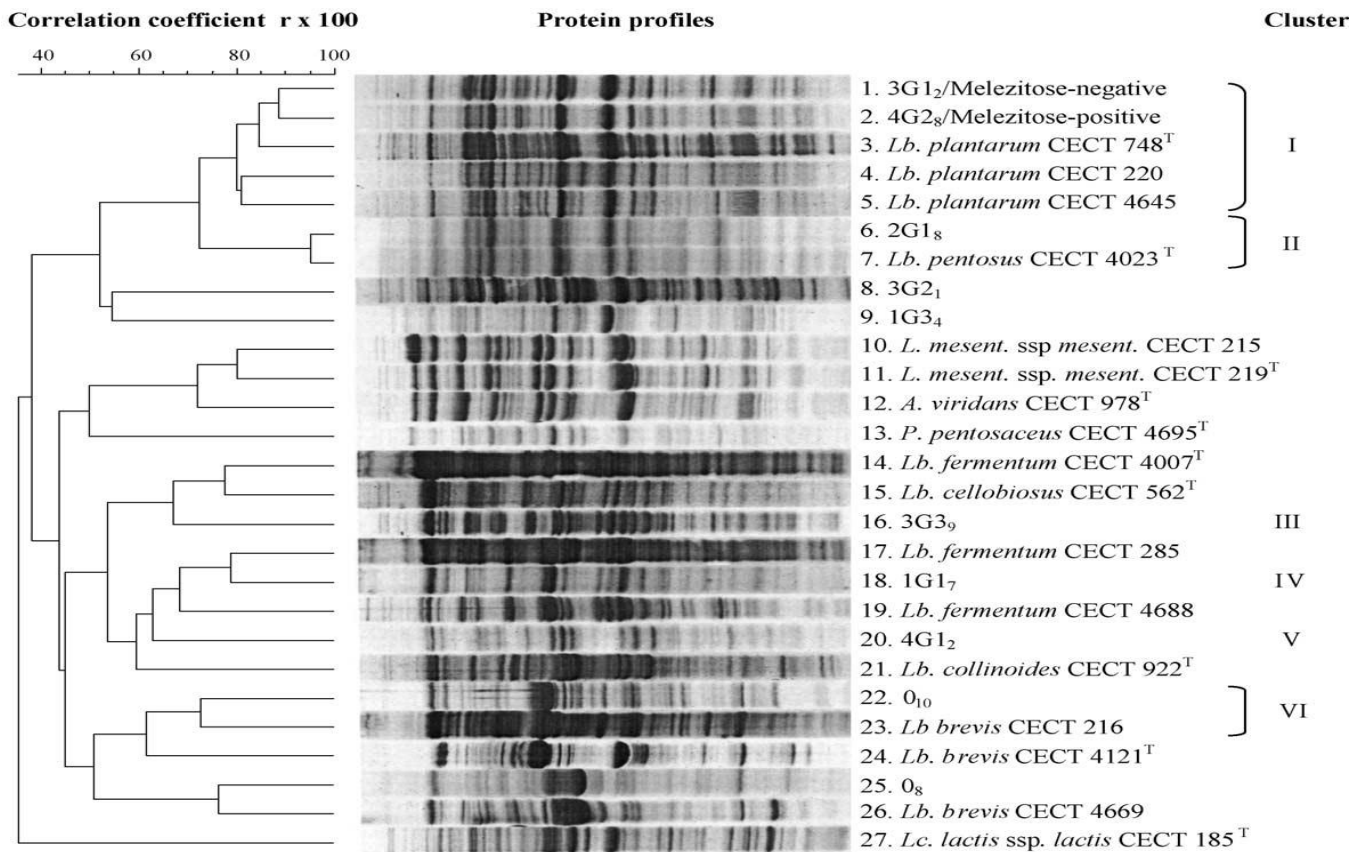


Figure 12: Profils protéiques d'isolats représentatifs de bactéries lactiques et des souches de référence (107).

Bien que cette technique est largement utilisée dans l'identification des bactéries lactiques, car elle offre l'avantage d'avoir un bon niveau de résolution taxonomique au niveau des espèces et des sous-espèces (37), elle comporte un inconvénient majeur qui est la charge de travail assez élevée (80).

➤ **MALDI -TOF-MS (Le Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry):**

La technique MALDI-TOF-MS est un outil prometteur et fiable d'identification bactérienne qui se base sur l'analyse de protéines de cellules entières et permet une identification des microorganismes au niveau de genre, de l'espèce et parfois même au rang de sous-espèce. Tout de même peu de rapports existent où le MALDI-TOF-MS est utilisé pour l'identification des bactéries lactiques comme : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Leuconostoc* (109, 110).

Stępień-Pyśniak et al., (2017) l'ont utilisée pour l'identification des espèces des *Enterococcus*, des oiseaux sauvages. Nacef et al., (2016), ont réussi à identifier sans ambiguïté des bactéries lactiques isolées à partir d'un fromage français Maroilles. Meghoufel et al., (2017), ont procédé par la même méthode pour identifier 36 bactéries lactiques isolées à partir de fromage Jben (111).

Chapitre II : Identification phénotypique des bactéries lactiques

Kačániová *et al.*, (2017), ont identifié les bactéries lactiques du fromage cottage de vache à l'aide de la même technique (111).

Le principe de cette technique se base sur l'ionisation des protéines bactériennes par un rayon laser et la création de pics caractéristiques (spectre) (112). Elle est faite soit sur des cellules entières, soit sur des extraits protéiques. L'analyse de ces dernières donne des spectres de haute qualité permettant une analyse plus fine (113, 114).

Une grande majorité des protéines bactériennes et des parties détectées par cette technique sont d'origine ribosomique (109). Mais d'autre protéine des bactéries lactiques comme : Enterocin A et Enterocin B dans *Enterococcus faecium* (115), Nisin et lacticin dans *Lactococcus lactis subsp lactis* peuvent être détectées (116).

La première étape est le dépôt de l'échantillon sur une plaque et l'ajout d'une matrice organique dont les propriétés physicochimiques permettent une co-cristallisation du mélange matrice/échantillon à température ambiante. L'étape suivante correspond à l'irradiation par un laser du mélange matrice-échantillon cristallisé qui aboutit à la désorption des molécules et l'ionisation des protéines matricielles (113, 117).

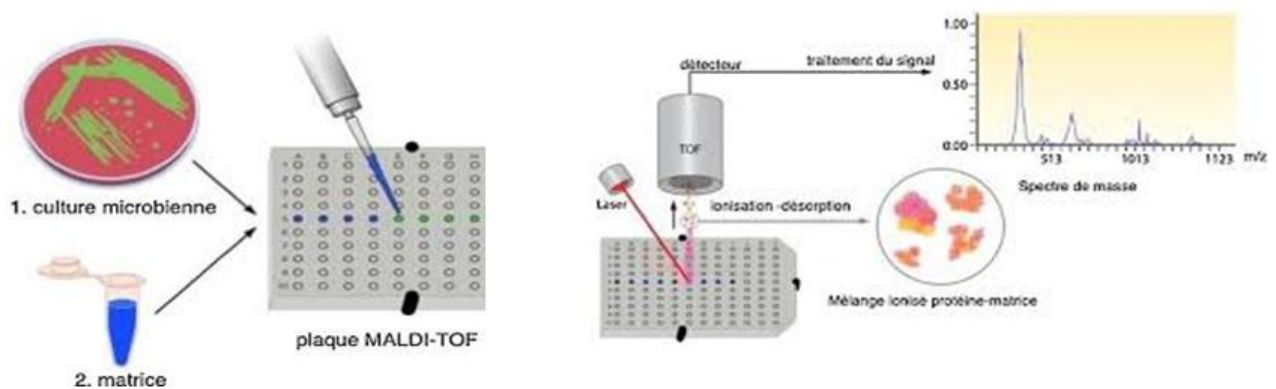


Figure 13 : Le principe de la technique MALDI-TOF-MS (113).

La dernière étape consiste en une accélération des ions (protéines) dans un champ électrique dirigé vers l'analyseur qui sépare les ions selon leur temps de vol (Time Of Flight). Ainsi, en fonction de leur rapport m/z , les ions (protéines) atteignent plus ou moins rapidement le détecteur où ils sont alors transformés en un signal électrique qui sera amplifié puis analysé (113, 117) de deux façons différentes (Figure14) :

1. Par l'approche basée sur la comparaison du spectre issu d'une bactérie à une bibliothèque spectrale de bactéries de référence. Cette Approches utilise des logiciels comme BioTyper (Bruker) (114). Elle est actuellement la plus utilisée en microbiologie car l'approches basées sur la bio-informatique nécessite la connaissance de tous les protéomes des espèces bactériennes (110, 114).

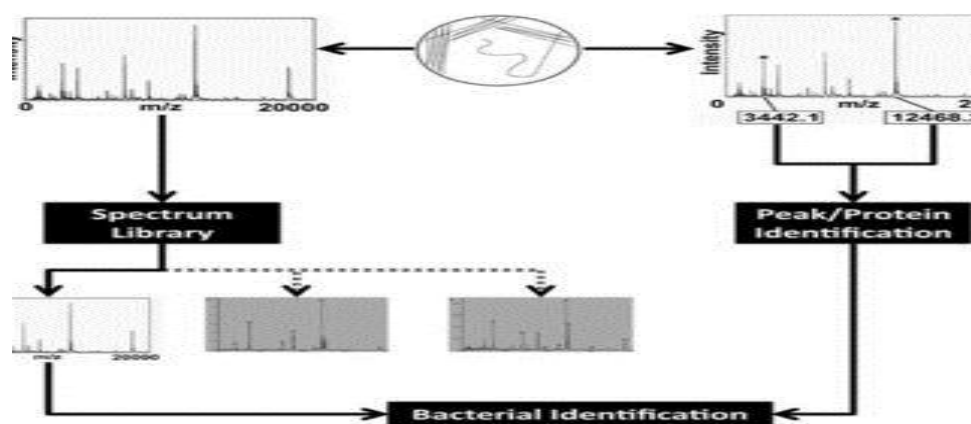


Figure 14 : L'approche basée sur la bibliothèque et la bio-informatique pour profiler les bactéries à l'aide de MALDI-MS (114).

2. Par une approche basée sur la bio-informatique où les masses (m/z) du spectre de bactéries lactiques inconnues sont comparées aux masses moléculaires des protéines contenues (**Tableau 5**). Cette Approches utilise des logiciels comme MASCOT et MATLAB (114).

Tableau 5 : Quelques protéines ribosomales détectables par la technique MALDI-TOF-MS (118, 119).

	<i>Le rapport m/z</i>							
Espèces	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus JCM 1136</i>	<i>Lactobacillus casei NBRC 15883</i>
Protéines								
L22: 50S ribosomal protein	12351.3	12741.7	12339.3	12286.3	12977.9	12580.4	12599.5	12599.5
L23: 50S ribosomal protein	11152.9	10959.8	10698.4	10790.7	10961.7	11051.9	11533.4	11564.4
L29: 50S ribosomal protein	7538.8	7579.8	7860.2	7901.2	7626.8	7581.8	7578.9	7578.9
S17: 30S ribosomal protein	10217.0	10087.7	10163.8	10027.7	10051.6	9998.5	9985.5	9985.5
S19: 30S ribosomal protein	10160.6	10355.9	10442.0	10420.0	10357.0	10232.8	10447.0	10447.0
L14: 50S ribosomal protein	13149.2	13206.4	12923.1	13080.2	13125.2	13296.4	13036.2	13031.2
L18: 50S ribosomal protein	13041.8	12959.8	12405.2	12924.9	12720.5	13066.0	13015.8	13015.8

Chapitre II : Identification phénotypique des bactéries lactiques

Bien que cette technique est puissante, rapide, fiable et rentable, et permet l'identification des bactéries directement à partir d'échantillons brutes (117). Elle a comme limites la présence des similitudes inévitables entre les spectres de certains groupes bactériens, et conduisent à une mauvaise discrimination entre les espèces, ainsi qu'à des erreurs d'identification (120). Des difficultés ont été observées avec *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus mitis* qui sont des espèces différentes mais elles ont des spectres très proches (117).

II.2.3.4. FTIR (Identification par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) s'est avérée être un outil robuste pour classer et identifier les bactéries lactiques (comme *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*) au niveau des espèces et des sous-espèces. Les spectres FTIR des bactéries sont spécifiques et montrent les caractéristiques spectrales des composants cellulaires, tels que les acides gras, les protéines membranaires et intracellulaires, les polysaccharides et les acides nucléiques (121, 122).

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon à analyser qui peut être à l'état gazeux, solide ou liquide. Cette absorption correspond spécifiquement aux liaisons présentes dans la molécule (123, 124).

Le rayonnement issu de la source infrarouge frappe le diviseur de faisceau et se divise en deux faisceaux, l'un est réfléchi vers un miroir fixe, l'autre transmis vers un miroir mobile ce qui introduit une différence de trajet. Les deux faisceaux sont recombinaés dans le diviseur de faisceau et génère un faisceau qui traverse ensuite l'échantillon avant d'aller vers le détecteur qui reçoit l'intensité lumineuse globale (125). Le détecteur enregistre les fluctuations des fréquences et dresse un interférogramme en mesurant les fréquences à tout moment. Ces données sont ensuite traitées par une méthode mathématique appelée transformation de Fourier (FT) à l'aide d'un ordinateur. On obtient ainsi la représentation finale d'un spectre IR (126).

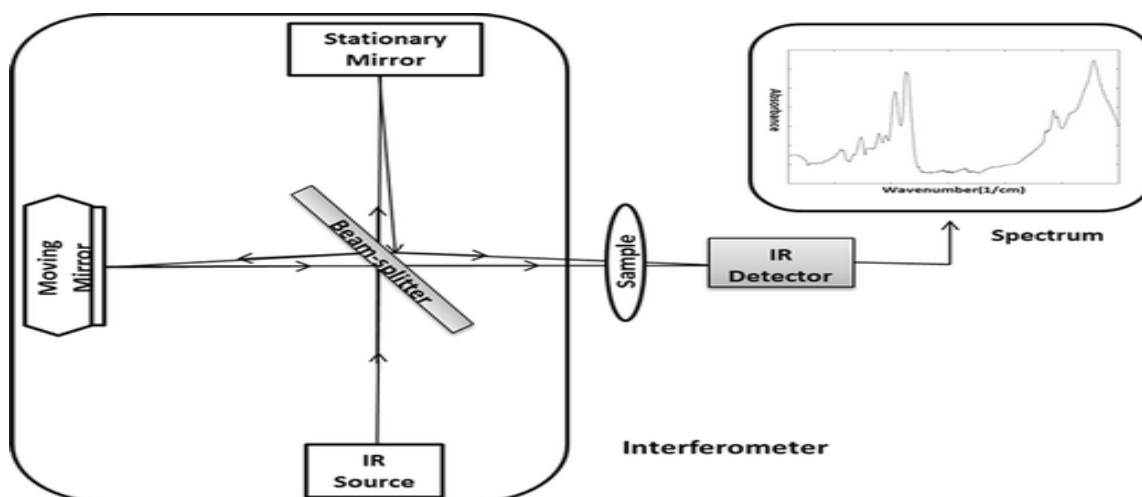


Figure 15: Composantes de la spectroscopie FTIR (127).

Plusieurs chercheurs ont utilisé la technique FTIR pour l'identification des bactéries lactiques c'est le cas notamment de **Samelis et al., (2011)**, qui ont identifié 300 colonies des bactéries lactiques isolées de deux types de fromage traditionnel grec Graviera, en comparant les spectres obtenus à ceux de deux bases de données CASO contenant 3287 spectres et 650 spectres dans la base de données APT. Les spectres FTIR ont fourni des identifications précises au niveau du genre mais, dans certains cas, les identifications au niveau des espèces n'étaient pas claires (128).

La spectroscopie FTIR est une technique non destructive, relativement rapide et facile qui nécessite très peu d'échantillon (nanogramme) et adaptée à l'analyse statistique multivarié pour l'interprétation des spectres. Les spectres de la plupart des échantillons peuvent être scannés et analysés en moins de 5 min et fournit des informations relatives à la propriété moléculaire fondamentale de l'échantillon (123, 126).

Cependant, elle n'est pas sans limites. La spectroscopie FTIR ne se base que sur les informations des liaisons chimiques, ne détecte pas les éléments ou les molécules diatomiques tels que N₂ et les régions spectrales de divers composants se chevauchent souvent, ce qui peut conduire à une mauvaise interprétation des résultats. Aussi, les conditions atmosphériques affectent l'équipement FTIR et les résultats spectraux, Les bactéries doivent être pures ou isolées, car il est difficile d'identifier directement les souches mixtes sans étape d'isolement. Les paramètres du milieu microbiologique tels que le milieu de culture, le temps de croissance et la température de croissance peuvent entraîner des variations dans les spectres, et enfin cette technique nécessite une expertise dans l'analyse des spectres pour la classification chimio-taxonomique (126).

Chapitre III :
Identification moléculaire des
bactéries lactiques

III.1 Historique de l'identification moléculaire

L'identification phénotypique de ces bactéries lactiques est fastidieuse, pas toujours fiable car certaines espèces ne peuvent pas être facilement différenciées (130). De nos jours, des méthodes moléculaires rapides ont été appliquées pour l'identification de ces bactéries et pour remplacer les méthodes traditionnelles moins efficaces (131).

Les premières méthodes d'identification moléculaire développées ont été l'hybridation ADN-ADN, l'analyse de séquence d'ADNr 16S, l'hybridation avec une sonde spécifique, l'analyse de RFLP et le ribotypage. Contrairement aux caractéristiques physiologiques et biochimiques, l'identification moléculaire est basée sur la composition constitutive des acides nucléiques plutôt que sur les produits de leur expression. Ces méthodes moléculaires sont souvent utilisées en association avec l'identification phénotypique conventionnelle (132).

La découverte de la PCR, de nouvelles technologies de clonage, de séquençage et la détection par fluorescence ainsi que l'accessibilité d'une grande quantité d'informations sur le Web ont contribué au développement de nouveaux outils moléculaires. La deuxième génération de méthodes moléculaires pour la détection et l'identification des genres et des espèces est composée de : réaction en chaîne par polymérase (PCR), la multiplex-PCR, le séquençage de gènes spécifiques, l'analyse de restriction de l'ADN ribosomique amplifié et l'électrophorèse en gradient dénaturant (DGGE) (132, 133).

III.2 Définition du terme identification moléculaire

L'identification moléculaire des bactéries utilise des technologies moléculaires pour évaluer des régions spécifiques d'un génome bactérien et déterminer de manière unique à quel genre, espèce ou souche appartient le micro-organisme (134). Le génome de toutes les bactéries contient des gènes conservés avec une faible variabilité qui sont spécifiques à chaque espèce (2).

Le processus d'identification génétique des bactéries est essentiellement une étude comparative. Afin d'identifier un organisme inconnu, ses séquences nucléiques clés sont comparées aux séquences nucléiques d'organismes connus. Une correspondance exacte se produira lorsque les séquences nucléiques des deux organismes sont identiques. Les individus apparentés ont un matériel génétique identique pour certaines régions et différent pour d'autres. Les individus non apparentés auront des différences significatives dans les régions nucléiques évaluées. Le développement d'une base de données de séquences clés uniques et caractéristiques d'une série d'organismes connus facilite ce type d'analyse (2). L'analyse des acides nucléiques à même permet la construction d'arbres phylogénétiques de haute signification pour calculer le degré de similarité et étudier la relation de la parenté entre les bactéries étudiées et les bactéries de base de données (135).

Chapitre III : Identification moléculaire des bactéries lactiques

Lorsque le pourcentage d'homologie est supérieur à 70% entre un isolat et une souche de référence, et que les critères phénotypiques concordent avec la définition de l'espèce, ces microorganismes peuvent être regroupées dans la même espèce (136).

III.3 Les acides nucléiques des bactéries lactiques et leur extraction

Les méthodes moléculaires permettent d'explorer la variabilité naturelle existante au niveau des acides nucléiques des bactéries lactiques comme dans l'ADN ou l'ARN, etc.

Le gène de l'ARNr 16S est considéré comme universellement présent dans toutes les bactéries lactiques et présente un degré élevé de conservation de séquence. L'analyse d'homologie de séquence de ce gène montre des résultats intéressants et il est considéré comme le gène le plus couramment utilisé dans l'étude de population bactérienne. Certaines bactéries ne sont connues que par la séquence de leur gène 16S (132).

Un certain nombre d'études récentes indiquent que d'autres gènes alternatifs présentent aussi une résolution taxonomique élevée pour l'identification des bactéries lactiques. C'est le cas notamment des gènes de la sous-unité RNA polymérase B, rpoB, le gène tuf, etc. (135).

L'extraction de l'ADN est un principe de base en analyse moléculaire et c'est l'un des facteurs de succès de l'amplification de l'ADN utilisée dans l'analyse des caractères génétiques (136).

L'objectif principal de ces étapes est de fournir un ADN de haute qualité pouvant être stocké pendant plusieurs années dans des conditions appropriées. De nombreuses techniques différentes sont disponibles pour isoler l'ADN génomique à partir de cellules bactériennes. Cependant, ils suivent les mêmes étapes de la rupture cellulaire à la purification matérielle génétique (137, 138).

Les étapes courantes de l'isolement de l'ADN comprennent :

1. La lyse des cellules:

Les cellules peuvent être lysées par des méthodes chimiques (à l'aide de détergents comme le CTAB), enzymatiques (protéinase K, lysozyme, etc.), ou mécaniques (billes de broyage et broyeurs).

2. La dénaturation des protéines et des complexes nucléoprotéiques:

Les protéines et les complexes nucléoprotéiques sont dénaturés par des détergents ioniques, des agents réducteurs (béta-mercaptoéthanol, etc.) ou des agents chaotropes (chlorure de guanidine). La protéinase K peut être également utilisée pour la digestion des protéines.

3. Inactivation des nucléases: Les nucléases sont inactivées par les agents chaotropiques (urée, chlorure de guanidine, thiocyanate de guanidine, etc.) et les chélateurs comme l'EDTA qui sont souvent inclus dans les tampons de lyse.

Chapitre III : Identification moléculaire des bactéries lactiques

4. La purification des acides nucléiques (ADN ou ARN): Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont récupérés dans un mélange incluant des débris cellulaires, tels que les protéines, les lipides, les polysaccharides, etc. Ces impuretés inhibent généralement les réactions enzymatiques (qPCR, RT-PCR, séquençage, méthylation, etc.). Il est donc essentiel de les éliminer pour obtenir des préparations pures d'ADN ou d'ARN (138).

La séparation entre les acides nucléiques et les impuretés se fait, soit en phase liquide par l'utilisation des solvants organiques (phénol-chloroforme) ou des détergents ioniques comme dodécylsulfate de sodium (SDS), soit en phase solide par simple chromatographie ou chromatographie échangeuse d'anion, etc. (137, 138).

Il existe des kits commerciaux qui permettent une purification rapide et de haute qualité des acides nucléiques. Ils sont utilisés dans plusieurs techniques notamment la PCR, la PCR quantitative en temps réel, le séquençage, etc. Ces kits séparent efficacement les macromolécules contaminants des acides nucléiques (139). Plusieurs Kits ont été utilisés pour l'identification moléculaire des bactéries lactiques comme le Kit Gen Elute Bacterial Genomic DNA Kit, le mini ADN QiAamp, Wizardgenomic DNA purification kit, etc., (140).

III.4 Méthodes d'identification moléculaire des bactéries lactiques

Les techniques moléculaires basées sur l'utilisation de l'ADN (Tableau 6) tels que, rp-PCR fingerprinting, le polymorphisme des fragments de longueur amplifiée, l'électrophorèse en champ pulsé de l'ensemble de l'ADN chromosomique digéré et la PCR en temps réel constituent aujourd'hui une partie importante de la taxonomie moderne des bactéries lactiques (141).

Tableau 6 : La liste des techniques utilisées pour l'identification génotypiques des bactéries lactiques (80).

Techniques	Pouvoir discriminatoire
RFLP	Les espèces et les souches
AFLP	Les espèces et les souches
PAPD-PCR	Les espèces et les souches
Rep-PCR	Les espèces et les souches
PFGE	Les espèces et les souches
Ribotyping	Les espèces et les souches
DGGE et TGGE	Les espèces et les souches
Séquençage	Les genres et les espèces
Hybridation ADN-ADN	Les genres et les espèces

III.4.1 Méthodes étudiant la structure des acides nucléiques

III.4.1.1 Le contenu en GC

Le premier élément des acides nucléiques à être utilisé en taxonomie est le pourcentage de bases guanine et cytosine (GC%). Ce paramètre ne prend pas en compte l'arrangement des nucléotides dans les molécules d'ADN. Chez les bactéries, le GC% varie de 25 % à 75 %. Cette valeur de GC% est généralement donnée dans la description d'une nouvelle espèce, ainsi les souches de même espèce ne doivent pas présenter une variation supérieure à 3 % et les espèces d'un genre donné ne doivent pas présenter une variation supérieure à 10 % (104).

Plusieurs méthodes directes ou indirectes ont été rapportées pour déterminer la teneur en GC de l'ADN bactérien. La plus courante est celle de la dénaturation thermique de l'ADN (T_m pour *melting temperature*) en raison de sa meilleure reproductibilité que les méthodes directes. Elle consiste à surveiller l'augmentation de l'absorbance à 260 nm par un spectrophotomètre UV pendant la dénaturation thermique de l'ADN (142, 143).

La température au point médian de l'élévation d'absorbance correspond au T_m . Cette dernière est linéairement liée à la composition moyenne de base d'ADN; une teneur plus élevée en G-C confère une stabilité thermique plus élevée, un ADN de référence est utilisé comme standard, pour calculer la teneur en GC par l'équation suivante:

$GC_x \text{ mol\%} = GC_r \text{ mol\%} + 1.99 (T_{mx} - T_{mr})$ (où x est l'organisme inconnu et r est l'organisme de référence) (142).

Les inconvénients majeurs de cette technique sont la précision et l'exigence d'un appareil coûteux (143).

La chromatographie liquide haute performance en phase inverse RP-HPLC avec détection ultraviolette a été utilisée pour déterminer la teneur en G + C après hydrolyse enzymatique de l'ADN avec la nucléase P1 et la phosphatase alcaline bactérienne. Après hydrolyse enzymatique de l'ADN, une HPLC en phase inverse est réalisée avec des étalons standards des déoxyribonucleosides (dT, dA, dG, dC) (144, 145). Les nucléosides libérés par la lyse enzymatique sont détectés à 270 nm et leurs quantités relatives sont déterminées sur les aires de pic, qui représentaient l'absorbance intégrée à 270 nm, et sur les coefficients d'absorption molaire relative en utilisant l'équation suivante:

Quantité relative de nucléoside en mol = zone de pointe / coefficient d'absorption molaire relative.

La composition de base d'ADN a été calculée comme suite:

$G + C \text{ mol\%} = \frac{G_r + C_r}{A_r + G_r + C_r + T_r}$ où (N_r = Quantité relative de nucléoside en mol) (144).

Chapitre III : Identification moléculaire des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont un faible contenu GC% < 50 %, à l'exception du genre *bifidobacterium* qui a un contenu G + C > 50 % et par ce fait appartient au genre des actinobactéries (143). Le **Tableau 7** représente le contenu GC de quelques espèces des bactéries lactiques (52).

Tableau 7 : Le contenu GC de quelques espèces des bactéries lactiques (52).

Espèces	GC%
<i>Streptococcus acidominimus</i>	39.7
<i>Lactococcus piscium</i>	38.5
<i>Leuconostoc argentinum</i>	40.5
<i>Lactobacillus collinoides</i>	46
<i>Pediococcus stilesii</i>	38

III.4.1.2 Hybridation ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN repose sur la dénaturation de molécules ADN totaux appartenant à deux souches, puis à leur réassociation (141).

Le principe des sondes nucléiques est de faire agir l'ADN bactérien à identifier (la cible), avec une séquence d'ADN spécifique de la bactérie recherchée (la sonde). Cette technique repose sur le phénomène d'hybridation qui se produit entre ces deux séquences d'acides nucléiques et qui peut s'effectuer sur un support solide ou en milieu liquide. De plus, l'une de ces séquences est toujours marquée de manière radioactive, enzymatique ou chimique. De cette façon, lorsque l'hybridation entre la sonde et la cible se produit, un signal est émis par le complexe, et il peut être analysé. Cette méthode permet alors la détection et l'identification de la cible (80, 146, 147). Une association supérieure à 70 % entre deux bactéries signifie qu'elles appartiennent à la même espèce (148).

La technique d'hybridation ADN-ADN a souvent été utilisée, seule ou en combinaison avec d'autres méthodes phénotypiques et génotypiques, pour l'identification des bactéries lactiques et des bifidobactéries dans les produits laitiers probiotiques (141)

Cette technique a été utilisée par **Magalhaes et al., (2008)** pour identifier la souche UFV H2b20 (**Figure 16**). Ils ont utilisé le gène ADNr 16S puis l'ADN total de la souche UFV H2b20 comme sondes pour l'hybridation avec l'ADN de *Lactobacillus delbruekii* et de *Lactobacillus acidophilus* (148).

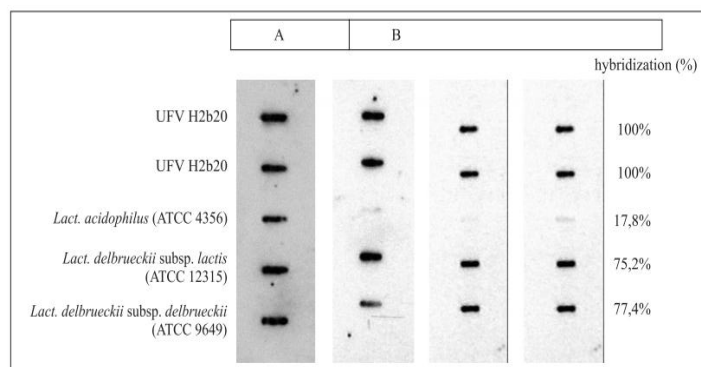


Figure 16 : Hybridation totale de l'ADN des souches étudiées. (A) : ADNr UFV H2b20 16S comme sonde ; (B) : ADN total UFV H2b20 comme sonde **(148)**.

Les résultats de cette étude ont montré une similarité de 17,8 avec *Lactobacillus acidophilus* (ATCC4356) et des similarités supérieures à 70 % avec les deux espèces *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp *delbrueckii* avec 75.2% et 77.4% respectivement ce qui prouve que la souche est une *Lactobacillus delbrueckii* **(148)**.

III.4.1.3 Séquençage de l'ADN ribosomal 16S

Le séquençage permet de séquencer un gène connu au lieu d'un génome complet. Le gène ciblé est l'ADNr 16s qui est spécifique et présent chez toutes les espèces . C'est un outil standard pour les études phylogénétiques et taxonomiques des bactéries en raison de la conservation de ce gène entre différentes espèces. C'est une méthode courante d'identification des souches bactériennes qui consiste à analyser la séquence de l'ADNr 16S codant l'ARN ribosomique 16S (ARNr16S) **(78)** car il est reconnu par la communauté scientifique pour être une base de comparaison efficace et fiable pour pouvoir à la fois comparer et différencier les bactéries entre elles **(78, 157)**.

L'amplification de ce gène par PCR à l'aide d'amorces universelles complémentaires et spécifiques des régions conservées permet de détecter la présence de n'importe quelle espèce bactérienne dans n'importe quel échantillon **(78)**.

Cette technique a été utilisé par **Tilahun et al., (2018)** pour l'identification de 24 isolats de bactérie lactique isolées à partir de pâte de teff fermenté.

Après extraction et purification de l'ADN par inisorb spin DNA extraction kit, deux amorces rD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CT C AG-3') et FD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3') sont utilisées pour l'amplification du gène ARN 16S par PCR. Les produits d'amplification sont purifiés sur gel d'agarose puis visualisés par bromure d'éthidium. Un séquenceur automatique d'ADN (qui utilise des marqueurs fluorescents à la place des marqueurs radioactifs) est utilisé pour le séquençage des gènes amplifiés (ADNr 16s) de chaque isolat et un logiciel Bioedit pour les

analysés. Après comparaison des séquences d'ADNr 16S des bactéries lactiques présumées aux données GenBank, seuls 10 isolats montrent une similarité significative de 92-98% avec les genres *Lactobacillus*, *Enterococcus* un des isolats est apparu être un *Bacillus subtilis* (149).

III.4.2 Méthodes de typages basées sur l'ADN

III.4.2.1 La technique RAPD (ADN polymorphe amplifié de manière aléatoire)

Random Amplified Polymorphic DNA ou en français L'ADN polymorphe amplifié de manière aléatoire (RAPD) est une technique d'empreinte d'ADN basée sur un PCR appelée aussi réaction en chaîne par polymérase amorcée arbitrairement (AP-PCR) (104).

Dans l'analyse RAPD, la ou les séquences cibles à amplifier sont inconnues et une amorce avec une séquence arbitraire (une séquence de 10 paires de bases générée aléatoirement ou une séquence de 10 pb générée aléatoirement par ordinateur) est conçue et synthétisée. Une fois ces séquences synthétisées, elles sont utilisées dans des réactions de PCR avec des conditions d'hybridation à faible astringence, ce qui entraîne l'amplification de fragments d'ADN de taille aléatoire (78). Il est également possible de combiner deux oligonucléotides ou davantage (RAPD multiplex) dans une seule PCR afin de produire des profils RADP plus fiables pour le typage des souches (150).

Après séparation des produits de PCR sur gel d'agarose, on obtient un profil de bandes caractéristique de la souche étudiée (150). Ce profile est capturé puis analysé par des logiciels d'analyse de gel tel que GelCompar. Ces programmes informatisés analysent les gels électrophorétiques, la parenté ou la similitude des modèles de bandes à l'aide de coefficients mathématiques et un dendrogramme basé sur les coefficients de similarité avec les souches de référence d'une base de donné est ensuite généré (151, 152).

Kaur et al., (2017), ont rapporté le succès de l'utilisation de la méthode RAPD-PCR pour la différenciation des souches de bactéries lactiques après avoir été comparés à des souches de référence (153).

Pour l'identification des bactéries lactiques à partir de la fermentation spontanée d'aubergines Almagro, Sanchez et al., (2004) ont utilisé la RAPD avec deux amorces aléatoires : OPL-05 et ArgDei-For et l'analyse des 149 souches isolées a donné 21 géotypes RAPD (R1 – R21) définis à un niveau de similitude minimum de 86% (154).

Chapitre III : Identification moléculaire des bactéries lactiques

Ces 21 géotypes ont été comparés à des souches de référence et ont été regroupés dans cinq clusters majeurs (RI à RV) qui ont un niveau de similitude de 39% ou plus (**Figure 17**). Le cluster RI n'a pas pu être identifié et les clusters RII, RIII, RIV et RV, qui englobaient 97 des 149 isolats, ont été attribués à l'espèce *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus brevis*, *Lactococcus pentosus* et *Lactococcus fermentum*, respectivement. Deux isolats (géotypes R11 et R21), qui présentaient des profils RAPD singuliers, n'ont été inclus dans aucun des principaux groupes donc n'est pas été identifié (**154**).

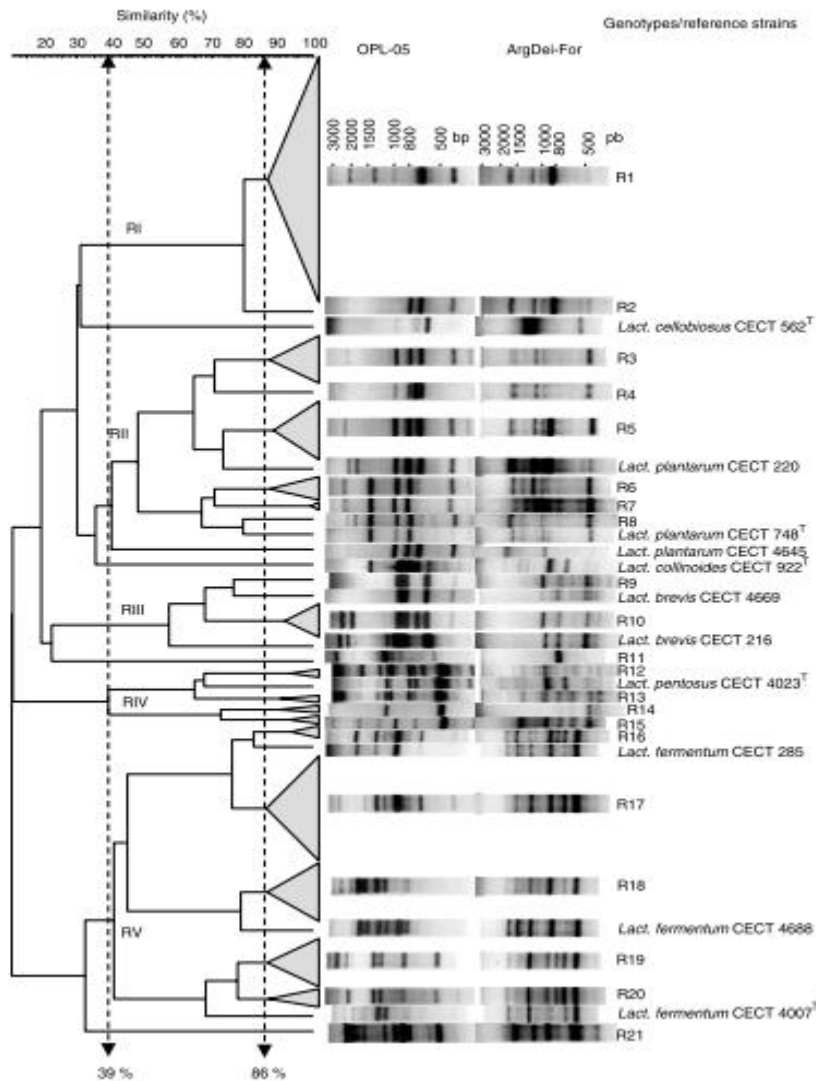


Figure 17 : Les empreintes digitales obtenues par RAPD pour chacun des 21 géotypes avec les deux amorces OPL-05 et ArgDei-For et les souches de références (**154**).

Les avantages de cette technique comprennent une applicabilité générale, un faible coût par réaction et une moindre expertise technique. De plus, aucune connaissance préalable de la séquence n'est requise et pour l'amplification par PCR, une quantité limitée d'ADN est requise (**151**). Cependant, comme les amorces RAPD ne sont pas dirigées sur une séquence spécifique, la

reproductibilité de la technique sur une période d'étude plus longue a souvent posé un problème (80).

III.4.2.2 La technique PFGE (Electrophorèse sur gel en champ pulsé)

L'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) est développée par **Schwartz et Cantor en 1984**. Elle sépare de gros fragments d'ADN de plus de 20 kpb et jusqu'à 10 Mpb qui ne peuvent pas être résolus par électrophorèse sur gel d'agarose conventionnelle (155).

L'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) de fragments d'ADN résultant de la digestion d'ADN génomique entier avec des endonucléases de restriction de coupe rares s'est avérée fiable pour le typage des bactéries lactiques (156). Une excellente différenciation des sous-espèces a été montrée en utilisant PFGE pour un certain nombre d'organismes, y compris les *lactobacilles* et les *bifidobactéries*. Dans certains cas, la PFGE a permis le regroupement des souches bactériennes au sein d'une espèce, distingue les souches de différentes espèces de bactéries lactiques et place même des isolats dans des espèces spécifiques (78).

Le typage des souches a été réalisé avec succès par PFGE pour le complexe *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* et ses trois sous-espèces (*bulgaricus*, *delbrueckii* et *lactis*), *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus sakei* (156).

Dans la PFGE, l'ADN bactérien est immobilisé dans des blocs d'agarose pour éviter tout dommage mécanique à l'ADN, puis le total d'ADN est digéré avec une endonucléase de coupe rare qui donne un nombre limité de fragments de poids moléculaire élevé. Les blocs d'agarose sont placés dans les puits de gel de migration après digestion enzymatique. Les fragments sont séparés par une variante d'électrophorèse sur gel dans laquelle les orientations du champ électrique changent périodiquement, permettant aux fragments d'ADN de taille de méga-base d'être efficacement séparés (157). C'est-à-dire, au lieu d'appliquer un courant électrique au gel dans une seule direction, comme cela se fait en électrophorèse conventionnelle, la technique PFGE impliquant l'application d'un champ électrique alternatif dans deux directions définies (**Figure 18**). Les modèles de bandes d'ADN (pulsotypes) sont ensuite comparés entre les isolats et les relations clonales sont déduites (157, 158).

Le choix d'une enzyme de restriction appropriée ou d'un ensemble d'enzymes est important pour obtenir des modèles révélateurs. Ces enzymes doivent avoir une fréquence de coupure faible, comme c'est le cas pour SmaI et SgrAI (158).

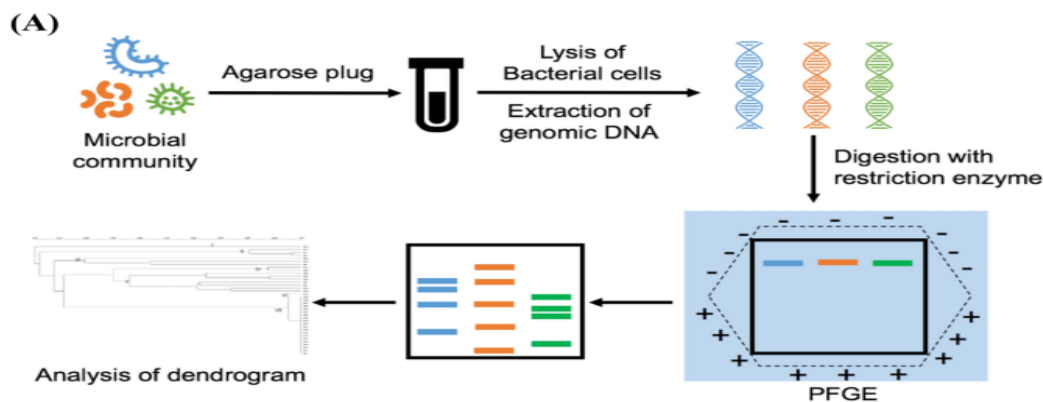


Figure 18 : Schéma de principe d'électrophorèse sur gel à champ pulsé (158).

La base de la séparation PFGE est la réorientation temporelle de la migration de l'ADN en pulsant périodiquement le champ électrique dans différentes directions (**Figure 19**). Ainsi, le choix des paramètres de commutation de temps d'impulsion de la technique PFGE sera influencé par la gamme de tailles de fragments d'ADN qui doivent être séparés. Des macro-fragments de restriction de différentes tailles ont chacun un intervalle de commutation minimum en dessous duquel il n'y a pas suffisamment de temps pour que la réorientation se produise (159).

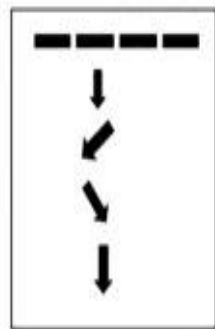


Figure 19 : Réorientation périodique de l'ADN par impulsions sur un gel PFGE (160).

Pour cette raison, les temps d'impulsions sont augmentés de manière additionnelle pendant la période d'électrophorèse pour permettre la résolution d'une plage de petits aux grands fragments. En modifiant les temps de commutation, courts et / ou plus longs, la séparation des fragments de tailles spécifiques peut être accentuée avec le temps d'électrophorèse total ajusté empiriquement pour obtenir la séparation souhaitée. Cet égard, un changement vers des intervalles de commutation plus longs nécessite généralement une augmentation du temps d'électrophorèse total (**Tableau 8**) (159).

Chapitre III : Identification moléculaire des bactéries lactiques

Tableau 8 : Exemples de plages de tailles d'ADN séparées par différents temps de commutation PFGE (159).

Gamme de taille d'ADN (kb)	Temps d'impulsion initial (s)	Temps d'impulsion final (s)	Durée (h)
1-50	0.1	2.0	7
1-100	1.0	3.0	12
1-200	1.0	8.0	13
25-250	1.0	12.0	17
25-300	1.0	17.0	17
25-400	1.0	23.0	20
50-500	5.0	35.0	22
50-600	5.0	42.0	22
50-700	5.0	50.0	22
50-900	0.5	60.0	22
50-1000	5.0	66.0	22
50-2000	5.0	120.0	22

L'analyse et la comparaison des données ou des résultats obtenus par la technique PFGE se font soit : - Par les critères de **Tenover et al., (1995)**, qui stipulent que les souches bactériennes qui sont « étroitement liées » auront une différence de deux à trois bandes dans le profil électrophorétique, les souches qui ont une différence de quatre à six bandes sont « possiblement apparenté », et des différences de sept bandes ou plus indiquent des souches non apparentées (160).

- Par des logiciels d'analyse de gel tel que GelCompar, Molecular Analyst Finger printing, BioImage, Phoretix and BioNumerics qui attribuent les souches en fonction de leurs différences de bandes et utilisent des coefficients de similarité basés sur la bande pour construire des dendrogrammes via des algorithmes. Les arbres phylogénétiques permettent ensuite de comparer et de calculer le degré de similitude entre les bactéries étudiés et les bactéries de référence (160).

Sánchez et al., (2004) ont utilisé la technique PFGE pour identifier 149 isolats de *Lactobacillus* obtenus à partir des saumures des fermenteurs utilisés dans la fermentation spontanée des aubergines d'Almagro. Les enzymes de restrictions SfiI et SmaI ont été utilisé pour la digestion d'ADN et l'appareil PFGE CHEF DRII avec des différents temps de commutation (0,1–6 s pendant 16 h, 5–45 s pendant 22 h) pour la séparation d'ADN (154).

Chapitre III : Identification moléculaire des bactéries lactiques

L'analyse des gels a montré cinq grappes principales (PI – PV) à un niveau de similarité de 35% et sont respectivement attribuées aux espèces : *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus fermentum* . En fonction des souches de référence incluses dans chacun de ces groupes, les 149 isolats étudiés ont donné 30 génotypes (P1-P30) avec un niveau de similitude de 91% (**Figure 20**) (154).

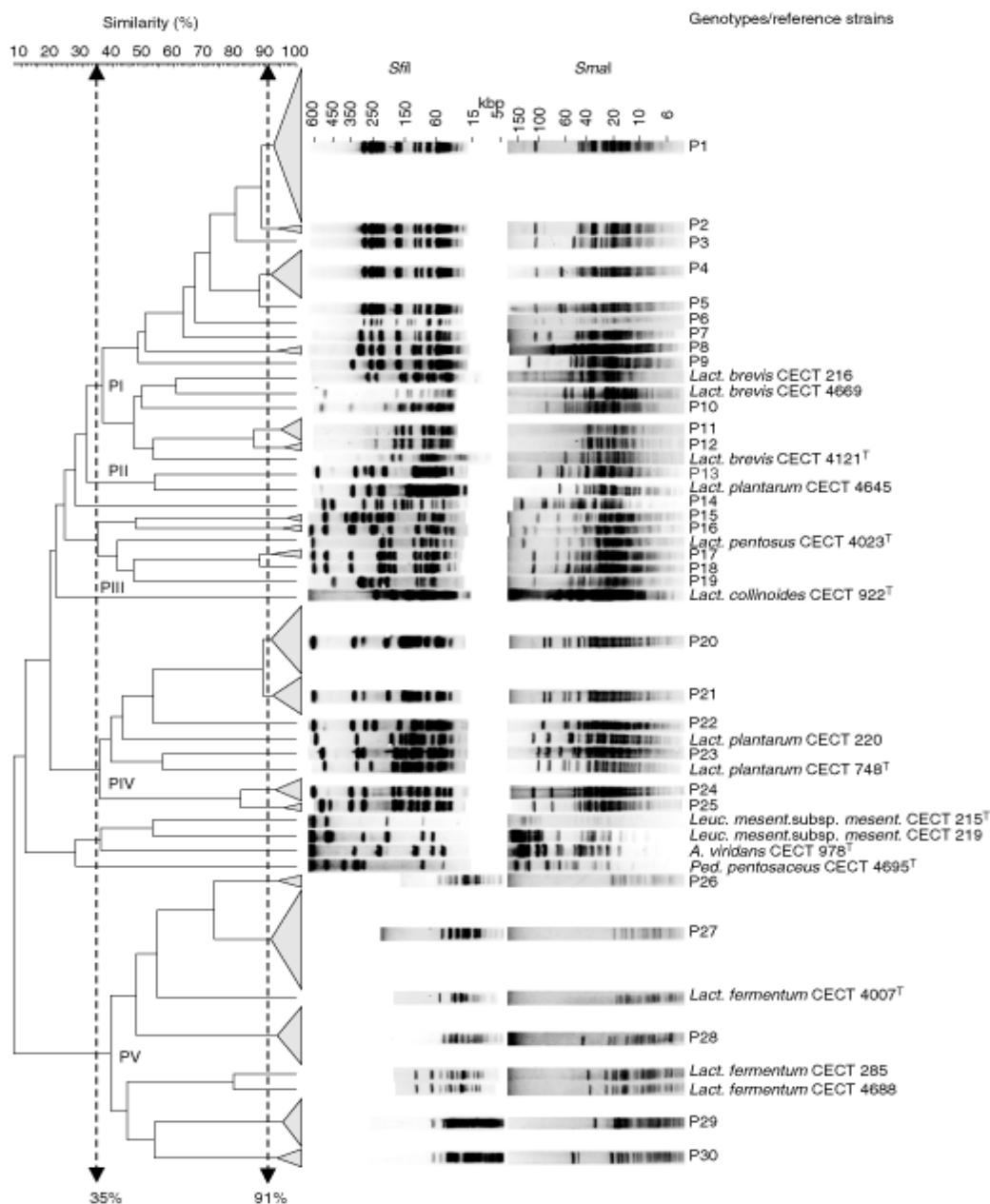


Figure 20 : Dendrogramme abrégé obtenu pour les isolats et les souches de référence à partir de l'analyse des profils PFGE cumulatifs (SfiI et SmaI) (154).

Les avantages du PFGE sont la bonne typabilité, une reproductibilité et un bon pouvoir de résolution. De plus, les coûts des matériaux et des équipements sont relativement faibles et la

manipulation de l'équipement est facile. Cependant, il est laborieux et prend du temps et peut donner des résultats ambigus s'il n'est pas effectué par un technicien bien formé (157).

Dans une comparaison récente, le PFGE s'est avéré supérieur à la fois au ribotypage et au RAPD dans la discrimination des souches d'espèces étroitement apparentées *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus rhamnosus* (78).

III.4.2.3. La technique RFLP (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction amplifiés)

La technique RFLP est également connue sous le nom de polymorphisme de longueur des fragments de restriction amplifiés, a été inventée par **Botstein et al., en 1980 (161)**. La RFLP est une technique qui exploite les variations de séquences d'ADN homologues. En combinaison avec la PCR, la RFLP a été utilisée pour l'identification rapide et la différenciation de micro-organismes étroitement liés tels que *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, etc. (162).

La première étape d'une analyse PCR-RFLP est l'amplification d'un fragment contenant la variation en utilisant des amorces universelles définies en alignant les séquences disponibles (163). Ceci est suivi d'un traitement du fragment amplifié avec une enzyme de restriction appropriée qui coupe l'ADN dans un site de restriction unique de 4 à 6 paires de bases. La présence ou l'absence du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction entraîne la formation des fragments de restriction de différentes tailles qui seront séparés par électrophorèse. Les bandes de tailles différentes se déplaceront à des distances variables à travers le gel et les profils de bandes sont alors comparés (163, 164, 165).

Plusieurs gènes peuvent être ciblés par la technique PCR-RFLP pour une identification fiable des bactéries lactiques. L'analyse par PCR-RFLP des fragments d'ARNr 16S amplifiés a été développée par **Woese et al., (1985)** et c'est l'une des méthodes les plus fréquemment utilisées pour différencier les espèces de *Lactococcus* et *Leuconostoc* (166). Aussi, l'amplification et la restriction du gène de l'ARNr 16S de 171 souches de bactéries lactiques avec AluI, HaeIII, BsmI, TspRI et HinfI ont été utilisées pour distinguer les espèces de *Lactobacillus* (167).

L'analyse PCR-RFLP des séquences *rpoB*, codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase, a été utilisée pour identifier les espèces de bactéries lactiques isolées du vin. Des résultats antérieurs ont démontré que le gène *rpoB* différencie mieux les espèces que le gène de l'ARNr 16S (168).

Dans une autre expérience, **Mancini, et al., (2012)** ont utilisé la technique PCR-RFLP pour cibler le gène tRNA^{Ala}-ADNr 23S dans le but d'identifier 75 souches des bactéries lactiques associées à l'écosystème laitier. Ce gène a été amplifié par PCR, digéré par les enzymes de restriction HindIII, HinfI, and TaqI et enfin les fragments résultant sont séparés par électrophorèse sur gel

Chapitre III : Identification moléculaire des bactéries lactiques

d'acrylamide puis visualisés par le bromure d'éthidium ou un autre colorant fluorescent (169). L'analyse des résultats été fait par le logiciel de vérification croisée BioNumerics logiciels, ainsi des coefficients de similarité été calculés et comparés aux références dans un dendrogramme crié UPGMA (133, 169, 170).

Cette technique à permit de différencier les isolats au niveau de l'espèce (Figure 21). 33 isolats sont regroupés avec les souches *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus casei* avec un niveau de similitude de 54,2%, neuf isolats regroupés avec *Lactococcus lactis subsp lactis* et *subsp cremoris* à 83,1%, deux isolats avec *Enterococcus faecalis* à 57,5%, un avec *Enterococcus faecium* à 66,7%, sept avec *Lactobacillus delbrueckii subsp lactis* et *bulgaricus* à 76,2%, dix avec *Lactobacillus fermentum* à 85,0%, une avec *Streptococcus thermophilus* à 81,3% et deux avec *Lactobacillus helveticus* à 71,4%. Ce qui prouve que le gène tRNA^{Ala}-23S rDNA représente une bonne cible et la techniques PCR-RFLP de ce gène représente une méthode fiable pour l'identification des bactéries lactique de l'écosystème laitier (169).

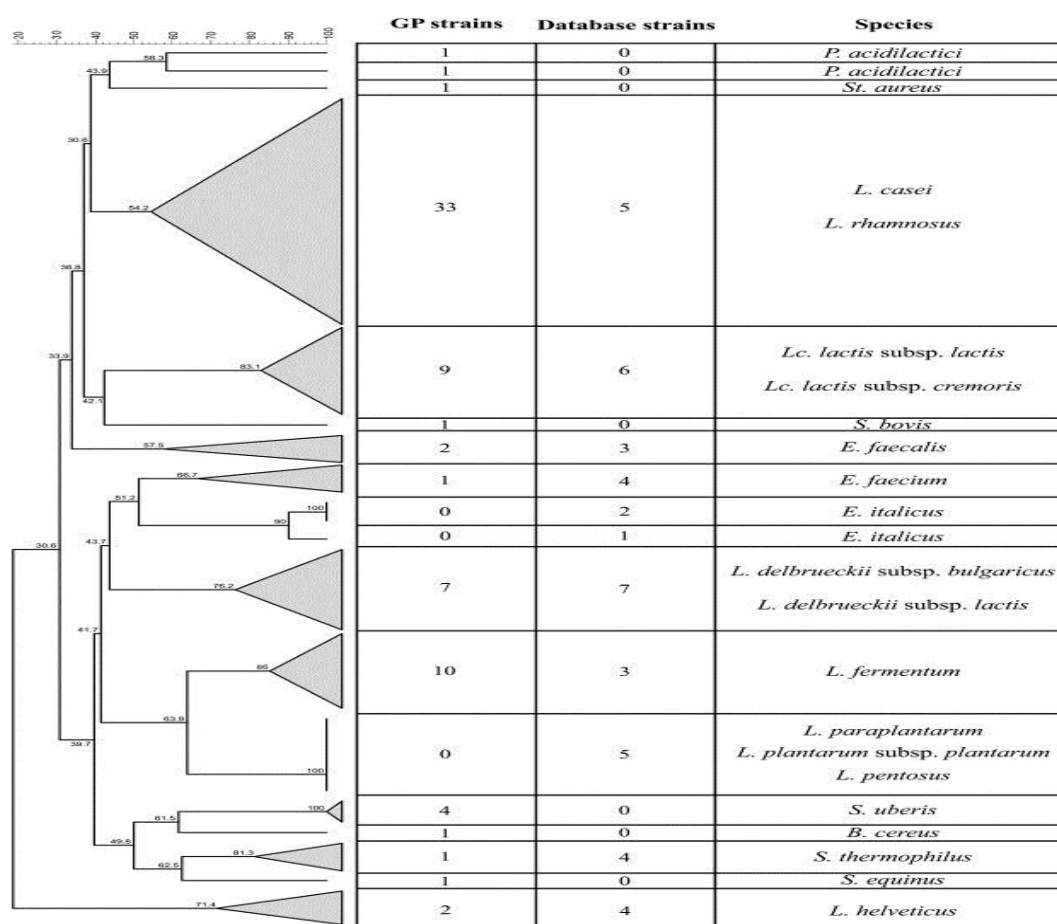


Figure 21: Dendrogramme UPGMA dérivé des profils d'empreintes tRNA^{Ala}-23S rDNA-RFLP des souches de référence et 75 isolats de bactéries lactiques de l'écosystème laitier (169).

Chapitre III : Identification moléculaire des bactéries lactiques

L'aspect le plus puissant de la PCR-RFLP est sa simplicité car elle peut être réalisée sans avoir besoin d'une expérience considérable en biologie moléculaire. Elle est rapide, moins chère et accessible aux laboratoires de terrain. Cependant, elle est laborieuse et nécessite des enzymes spécifiques et coûteuses (161).

III.4.2.4. La technique AFLP (Polymorphisme des fragments de longueur amplifiée)

Le polymorphisme des fragments de longueur amplifiée est une technique de prise d'empreintes d'ADN développée par Vos *et al.*, (1995). Elle est basée sur l'amplification par PCR sélective de fragments de restriction après une digestion totale de l'ADN génomique (141, 19).

Cette technique a été souvent utilisée pour l'identification spécifique de souches probiotiques (141).

Le principe de cette technique est schématisé dans la **Figure 22**, L'ADN génomique est digéré par deux enzymes de restriction différentes : une avec une coupure fréquente (l'enzyme de restriction à quatre bases MseI (5'-T/TAA-3')) et une avec une coupure rare (l'enzyme de restriction à six bases EcoRI (5'-G/AATTC -3')) (137, 146). MseI sert à générer de petits fragments qui s'amplifient et se séparent bien sur le gel, alors qu'EcoRI limite le nombre de fragments à amplifier (146). Ensuite des adaptateurs de séquences connus (20 nucléotides) (**Tableau 9**) et spécifiques des enzymes de restriction utilisées, sont ajoutés aux extrémités des fragments de restriction générant ainsi une matrice pour l'amplification.

Tableau 9: Les séquences des adaptateurs EcoRI et MseI (146).

Adaptateurs	La séquence nucléotidique
<i>EcoRI</i>	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
<i>MseI</i>	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'

Enfin, deux amplifications sélectives successives sont réalisées. La première, dite une amplification pré-sélective permet une première sélection de fragments en amplifiant uniquement les fragments de restriction d'ADN qui ont ligaturé un adaptateur aux deux extrémités. Elle est réalisée avec deux amorces correspondants aux deux adaptateurs portant chacun un nucléotide supplémentaire. Ce nucléotide supplémentaire permet une autre première sélection en amplifiant 1/4 des fragments ayant ligaturé un adaptateur aux deux extrémités. La deuxième amplification, est une amplification sélective réalisée à l'aide de deux amorces correspondantes aux adaptateurs avec 3

nucléotides supplémentaires. Cette fois ces nucléotides supplémentaires rendent l'amplification plus sélective et diminuent le nombre de fragments de restriction amplifiés (polymorphisme) (141).

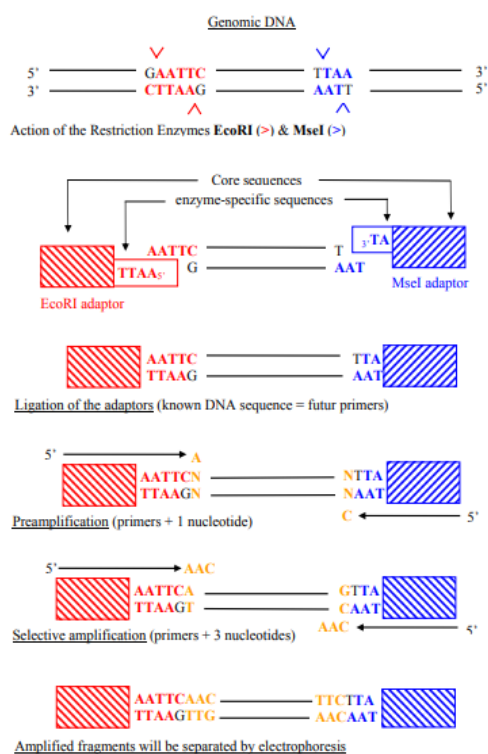


Figure 22 : Principe général de l’AFLP (Amplified Fragment-LengthPolymorphism) (141).

Ces fragments amplifiés sont séparés par électrophorèse sur gel d’acrylamide et visualisés par coloration au nitrate d’argent ou révélés grâce à un marquage radioactif ou fluorescent lors de l’amplification sélective, (l’une des amorces, généralement l’amorce EcoRI est marquée avec le colorant). C’est la combinaison enzyme/amorce qui permet de révéler le polymorphisme entre les individus (137, 141, 146).

L’avantage de l’AFLP est la génération rapide de centaines marqueurs hautement répliquables à partir de l’ADN de l’organisme, permettant ainsi un génotypage de haute résolution des empreintes digitales, de plus elle est reproductible, rapide et rentable (137).

III.4.2.5. La technique ARDRA (Analyse de restriction de l’ADN ribosomique amplifié)

Analyse de restriction de l’ADN ribosomique amplifié implique une amplification enzymatique en utilisant des amorces dirigées vers les régions conservées aux extrémités de la petite sous-unité ribosomale 16S bactérienne, suivie d’une digestion à l’aide d’enzymes de restriction à quatre nucléotides. Les profils obtenus à partir de plusieurs enzymes de restriction peuvent être comparés à ceux obtenus à partir de souches de référence (78, 141).

Chapitre III : Identification moléculaire des bactéries lactiques

Rodas *et al.*, (2003) ont utilisé la technique ARDRA pour identifier 376 isolats de bactéries lactiques obtenus à partir de mout de raisin et du vin. Après une culture sur MRS et une amplification du gène ARNr 16S par PCR, des digestion simples et combinés sont réalisées par les enzymes de restriction BfaI (5'-C/TAG-3'), MseI (5'-T/TAA-3'), AluI (5'-AG/CT-3'), et les fragments générés sont séparés sur une électrophorèse sur gel d'agarose puis révélés par une coloration au BET (171).

Enfin, les chercheurs ont utilisé le logiciel BioNumerics pour réaliser un dendrogramme (Figure 23) et analyser les données de chaque souche avec chaque enzyme de restriction (chaque enzyme seul puis combinées) par la méthode de regroupement UPGMA qui permet la transformation d'une matrice de distances (la matrice de similarité par paire entre différents organismes, populations, ou séquences de nucléotides) en un dendrogramme (171).

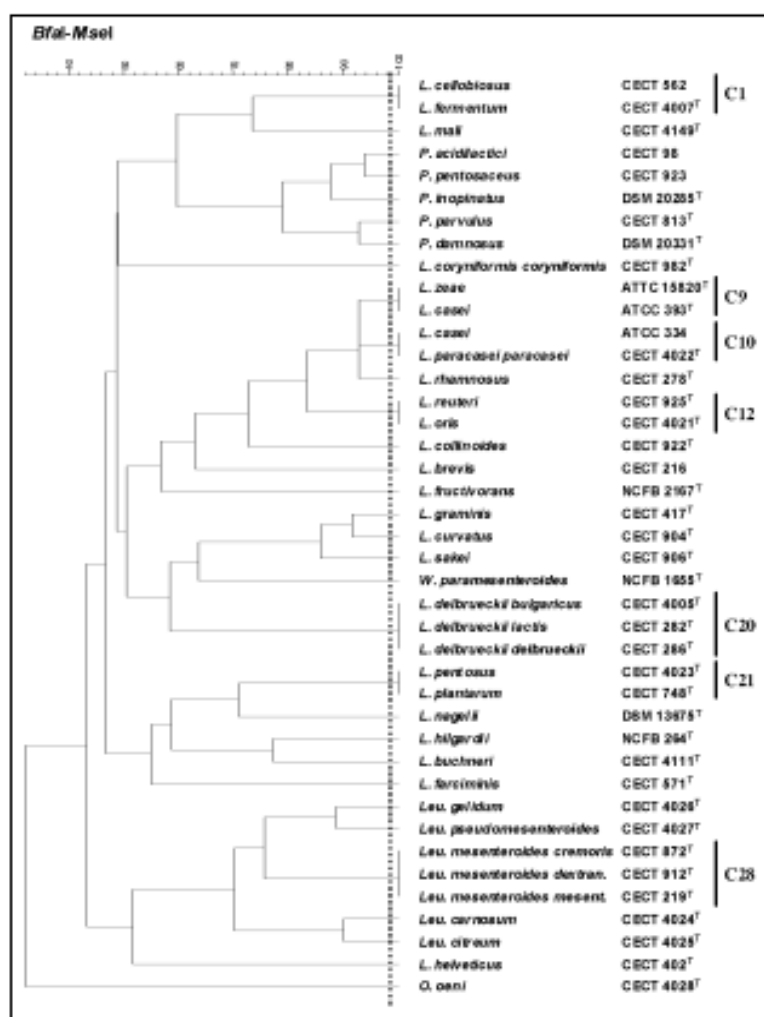


Figure 23: Dendrogramme basé sur le regroupement UPGMA des modèles BfaI et MseI combinés obtenus à partir des souches de référence des bactéries lactiques avec une valeur de similarité de 99 % (171).

Selon ces chercheurs, cette technique a permis de discriminer 32 des 36 espèces de référence et d'identifier 342 isolats de moûts et de vins appartenant aux espèces: *Lactobacillus bravis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostocudenoides parvoculus* et *Pediococcus pentosaceus*(171).

L'ARDRA est une technique très utile pour cribler des clones ou des isolats avant de séquencer leurs génomes. Cela aide à révéler les similitudes et minimise ainsi les coûts de séquençage. Tout de même l'application de cette technique nécessite des informations concernant l'ADN 16S afin de sélectionner les enzymes de restriction appropriées car une digestion incomplète entraîne des changements dans le schéma de bandes (137, 141).

III.4.2.6. La technique PCR en temps réel

La technique PCR consiste en une succession de cycles comprenant chacun une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C, une étape d'hybridation (40°C-60°C) de deux amorces spécifiques de la séquence à amplifier, et une étape d'élongation (à 72°C) de l'ADN par une ADN polymérase (généralement Taq polymérase) (137, 172).

La PCR quantitative en temps réel repose sur le même principe que la PCR classique, excepté qu'elle nécessite l'utilisation d'une sonde en plus des deux amorces, les sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (exemple : technique SYBR.), soit sur une séquence d'ADN précise (exemple : technique Taqman) (172, 173).

- Technique SYBR :

C'est la méthode la plus simple, elle est basée sur l'utilisation d'un colorant, le *SYBR green*, qui a la propriété de devenir fluorescent lorsqu'il se lie à une molécule d'ADN double brin. À chaque cycle de polymérisation, de nouvelles molécules d'ADN double brin sont produites, et il y a émission d'un signal fluorescent proportionnel à la quantité d'ADN. Ce signal est reporté sur un graphique pour chaque cycle du PCR en temps réel.

L'utilisation du *SYBR green* est très simple et moins coûteuse que les autres méthodes, mais cette méthode de détection n'est pas spécifique : toutes les molécules d'ADN, dont les dimères d'amorces et les molécules d'ADN amplifiées de façon non spécifique, seront détectées au même titre que le produit d'amplification cible (172, 174).

- Technique Taqman :

La **Figure 24** représente le principe de la PCR quantitative en temps réel avec l'utilisation d'une sonde TaqMan. Une sonde TaqMan est un oligonucléotide complémentaire de l'un des brins de la séquence cible, à laquelle elle s'hybride pendant la phase d'hybridation.

Chapitre III : Identification moléculaire des bactéries lactiques

Elle porte à son extrémité 5' un fluorochrome émetteur (reporter), et à son extrémité 3' un deuxième fluorochrome suppresseur (quencher), lorsque la sonde est intacte, l'émission du reporter est inhibée par le quencher. Au cours de la polymérisation, l'activité exonucléase 5' → 3' de la Taq polymérase dégrade la sonde Taqman, donc les fluorophores ne seront plus reliés entre eux et l'émission du reporter sera augmentée (172, 173).

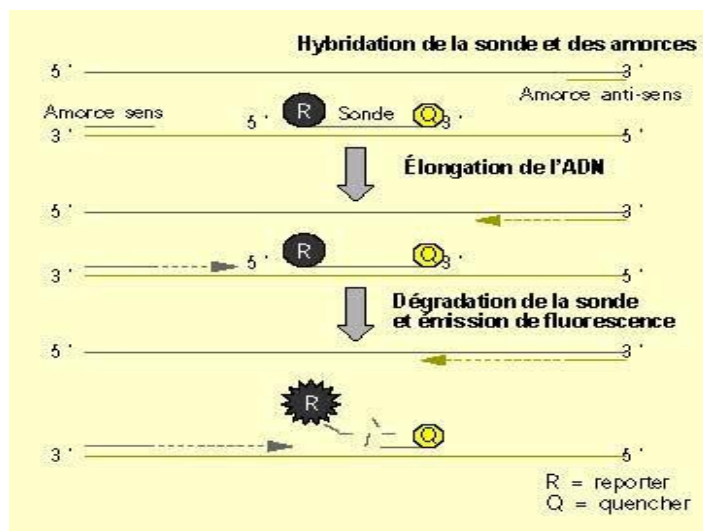


Figure 24 : Principe de la PCR quantitative en temps réel avec sonde TaqMan (173).

La mesure de la fluorescence permet de déterminer en temps réel si le fragment recherché (amplicon) est effectivement présent sans avoir besoin de faire une électrophorèse, de plus la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction PCR.

La réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR), est une technique très sensible qui peut être utilisée pour quantifier les gènes d'intérêt (gènes fonctionnels ou ARNr 16S) (172, 173).

Schmidt et al., (2008) ont utilisé la technique PCR en temps réel pour identifier *Lactobacillus buchneri* parmi 11 isolats de bactéries lactiques isolées d'un fourrage vert. Ces isolats sont cultivés dans le bouillon MRS, ensuite une amplification dans Fast real time PCR system est réalisée avec 2 amorces (amorce sens LBF2 (5'-GAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACCA-3') et amorce anti sens LBR1 (5'-CGCCTTGGTAGGCCGTTACCTTACCAACA-3') qui génèrent un fragment de 130pb) et de SYBR green. La visualisation des fragments amplifiés est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose avec une coloration au bromure d'éthidium (175).

Les chercheurs ont confirmé la présence de la souche par l'apparition du fragment 130pb seulement dans la ligne 5 de *Lactobacillus buchneri*. A l'exception de l'ADN matrice isolé de

Lactobacillus buchneri, aucun produit d'amplification n'a été observé avec ces tests PCR (Figure 25) (175).



Figure 25 : Analyse électrophorétique après amplification (175).

Les avantages de la PCR quantitative en temps réel sont sa rapidité de mise en œuvre et un risque nul de contaminations post-PCR du fait que les tubes ne sont pas ouverts après amplification. En revanche, la PCR quantitative en temps réel est très sensible à la présence d'inhibiteurs (protéines, polysaccharides, solvants organiques..., qui nécessite une bonne purification des ADN extraits (172).

4.2.7. Techniques ribotypages

Le ribotypage est une technique moléculaire pour l'identification et la classification des espèces et souches bactériennes basée sur les différences de leur ARNr (141).

Dans cette technique l'ADN est extrait puis digéré par un enzyme de restriction spécifique et les fragments résultants sont séparés selon leur taille par une électrophorèse sur gel d'agarose. Ces fragments sont transférés sur une membrane de nylon qui est incubée en présence de sondes d'ADN spécifiques qui s'hybrident aux gènes codant pour l'ARNr 16S et 23S). Après lavage, un substrat enzymatique, capable de produire un signal fluorescent ou chromogène est ajouté à la membrane de nylon pour visualiser les fragments d'ADN. Le profile observé de la membrane de nylon est utilisé pour l'identification et la classification des souches (78, 141).

Le ribotypage permet le typage de tous les isolats, il est reproductible, il a un pouvoir discriminant élevé et il génère des modèles simples. Cependant, il est également long et coûteux. L'utilisation d'un ribotypage automatisée peut constituer une alternative plus facile et plus rapide, car ce système permet une identification dans un délai plus court de 8 heures. Ce modèle a été utilisé pour évaluer et caractériser 91 souches des groupes *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus acidophilus* et la plupart des isolats ont pu être distinguées au niveau de l'espèce (78, 137).

III.4.3 Méthodes pour étudier les populations complexes

II.4.3.1 Les techniques DGGE (Electrophorèse sur gel gradient de dénaturation) et TGGE (Electrophorèse sur gel à gradient de température)

L'électrophorèse sur gel gradient de dénaturation (DGGE) et l'électrophorèse sur gel à gradient de température (TGGE) sont des méthodes indépendantes de la culture, utilisées dans l'étude des communautés microbiennes (176).

Ces techniques basées sur la PCR permettent la séparation d'un mélange de fragments d'ADN amplifiés de taille identique en fonction de leur séquence, sur un gel d'acrylamide contenant un gradient de dénaturation, donc l'ADN double brin (ADNdb) devient simple brin (ADNsb). Des gels de polyacrylamide constitués d'un gradient dénaturant linéaire formé par l'urée et le formamide sont utilisés pour la DGGE, tandis qu'un gradient de température linéaire est utilisé dans la TGGE (78). La PCR-DGGE est capable de détecter des cellules vivantes et mortes non cultivables et permet une analyse rapide des espèces et des changements dans les communautés microbiennes (177).

Le principe général de la technique DGGE consiste à amplifier les régions hypervariables des gènes codant l'ARNr 16S, ou d'autres gènes tels que le gène *rpoB* (codant la sous-unité β de l'ARN polymérase) qui sont encadrées par des régions consensus. Les ADN amplifiés, de taille identique mais de séquence différente lorsqu'il s'agit d'espèces différentes, sont séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide contenant un gradient d'agents dénaturants (généralement urée et formamide). Les fragments d'ADN double-brin migrent à travers le gel jusqu'à ce que les conditions chimiques provoquent leur dénaturation, entraînant ainsi un ralentissement de leur migration et leur immobilisation. Cependant, les fragments ne sont pas totalement dénaturés en raison de la formation d'un « GC clamp » due à l'utilisation d'une amorce PCR présentant une extrémité 5' riche en GC. Le point de dénaturation d'ADN dans le gel dépend de la séquence nucléotidique et de la teneur en GC (%) du fragment. Des séquences différentes ont des domaines de fusion différents et par conséquent des points d'arrêt différents dans le gel. Les amplifiats d'ADN de bactéries d'espèces différentes sont séparés par leur distance de migration dans le gel. L'identification de chaque espèce est obtenue soit en repérant la distance de migration par rapport à un ADN de référence de l'espèce, soit par purification et séquençage de l'ADN de la bande extraite du gel et par comparaison avec les banques de données disponibles (150).

Le DGGE est de plus en plus utilisé pour l'analyse des bactéries lactiques dans les procédés ou produits de fermentation alimentaire. Il est toujours sujet à des optimisations pour une identification directe sans utiliser de techniques d'identification supplémentaires. À cet égard, l'utilisation d'amorces spécifiques au genre représente une étape importante, qui se traduit généralement par un

Chapitre III : Identification moléculaire des bactéries lactiques

profil de bandes moins complexe et une amplification pré-sélective des membres les moins abondants d'un écosystème. Au sein des bactéries lactiques, des amorces de PCR spécifiques ciblant les bifidobactéries et les genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella* ont été conçus (80).

Hong et al., (2014) ont identifié les profils des espèces des bactéries lactiques isolées des échantillons du chou chinois salé D, H et W par la techniques DGGE, en utilisant des amorces ciblant la région V3 de l'ARNr 16S : GC-338f [5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCA GCAG-3'] et 518r [5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3']. Les bandes produites ont été excisées des gels, purifiés, séquencé puis comparés avec la base de données GenBank pour une identification précise des germes.

Les résultats de cette étude sont présentés dans la **Figure 26**. Cette dernière montre que neuf isolats sont identifiés. Seuls cinq étaient apparentées aux bactéries lactiques avec une homologie de séquences $\geq 93\%$ de celles de la base de données NCBI. Ainsi l'isolat 1 représente *Leuconostoc mesenteroides*, l'isolat 2 représente *Lactobacillus sakei*, l'isolat 3 représente *Lactobacillus curvatus*, l'isolat 5 représente *Leuconostoc gasicomitatum*, l'isolat 6 représente *Leuconostoc carnosum* (178).

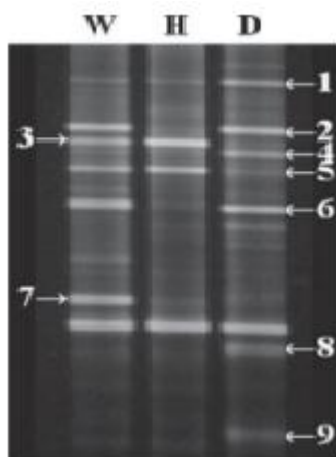


Figure 26 : Modèles PCR-DGGE de la région V3 du gène de l'ARNr 16S à partir des échantillons de chou chinois salé D, H et W. (178).

III.5. Les avantages et les limites de l'identification moléculaire

Actuellement, un grand nombre de techniques essentiellement moléculaires sont disponibles pour l'identification des bactéries lactiques de procédés industriels et les produits alimentaires (80). Mais chacune de ces techniques a ses avantages et ses limites qui la rendent utile dans certaines études et restrictive dans d'autres (179).

Chapitre III : Identification moléculaire des bactéries lactiques

Les techniques moléculaires sont des outils puissants d'identification des bactéries lactiques et sont largement utilisées pour remplacer les méthodes traditionnelles moins efficaces qui possèdent plusieurs problèmes affectent l'identification des bactéries lactiques **(180)**.

Leurs importances résident dans leur applicabilité universelle et leur pouvoir discriminatoire des espèces et sous espèces; ainsi des souches étroitement apparentées présentant des caractéristiques phénotypiques similaires peuvent être distinguées de manière fiable. Aussi, elles ont l'avantage d'être rapides, moins laborieuses et plus sensibles, spécifiques et efficaces par rapport aux méthodes conventionnelles **(139)**.

Pour s'affranchir du problème des microorganismes non cultivables, les techniques de biologie moléculaire se sont développées, ce qui a permis une caractérisation plus exhaustive de la diversité microbienne. Ainsi ces techniques peuvent identifier les bactéries cultivables et aussi les non cultivables. De plus, grâce à ces méthodes, la quantité d'échantillon nécessaire a été fortement réduite. En effet, basées sur les spécificités du génome de chaque espèce, les techniques de biologie moléculaire permettent de distinguer génétiquement les microorganismes dans des environnements complexes **(133)**.

Il existe beaucoup de choix au niveau des techniques de biologie moléculaire pour l'étude des populations bactériennes. La technique utilisée dépendra du but de l'étude, du budget, des habitudes du laboratoire, de la complexité de la population étudiée et du temps disponible **(133)**.

Bien que les approches moléculaires restent les techniques standards pour l'identification des bactéries lactiques, elles présentent certaines limites. Ces techniques avancées ont été remises en question en raison de l'étendue de leur base de données, de la nécessité de procédures complexes, d'un personnel formé, d'équipements spécialisés et coûteux. La nécessité d'une connaissance a priori de la séquence cible est important et la mutation occasionnelle de l'ADN génomique peut compromettre la détection. Mais toutes ces limites n'ont pas un grand effet sur l'identification des bactéries lactiques et l'identification moléculaire reste l'approche idéale pour l'identification de ces bactéries **(77, 181)**.

Conclusion

Conclusion

En raison de leurs propriétés fermentatives bien documentées et revendiquées pour la santé, les bactéries lactiques sont l'un des groupes de bactéries les plus importants de l'industrie alimentaire. L'identification correcte des bactéries lactiques est d'une importance capitale du point de vue technologique, écologique et sécuritaire.

En termes de ce travail, plusieurs pistes d'identification des bactéries lactiques sont vues. A savoir l'identification phénotypique et l'identification moléculaire.

L'identification phénotypique des bactéries lactique se base sur l'étude des propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques. Elle est considérée depuis longtemps comme la procédure conventionnelle d'identification des bactéries lactiques.

Malgré que ces techniques sont applicables et de faible cout, elles demandent beaucoup de travail et de temps, elles ont une mauvaise reproductibilité et ne sont pas adaptées aux germes non cultivables. Aussi, ces techniques ne sont pas toujours capables d'identifier le microorganisme au niveau de l'espèce, et encore moins au niveau de la souche.

L'identification moléculaire est basée sur l'analyse des acides nucléiques comme l'ADN ou l'ARN. Récemment, les techniques moléculaires ont été appliquées pour l'identification des bactéries lactiques et ont conduit à une augmentation du nombre de bactéries identifiées.

Contrairement aux techniques phénotypiques, les outils d'identification et de caractérisation moléculaires sont beaucoup plus cohérents, rapides, fiables, reproductibles, moins laborieux, plus sensibles, spécifiques et peuvent discriminer même entre des groupes d'espèces étroitement apparentés, qui sont autrement impossibles à distinguer sur la base du phénotype.

L'avantage le plus important est que les techniques d'identification moléculaire sont applicables pour les germes cultivables et aussi non cultivables. Malheureusement, elles présentent aussi quelques limites comme la nécessité de procédures complexes, d'un personnel formé, d'équipements spécialisés et coûteux. Mais ces limites n'ont pas un grand effet sur le processus d'identification.

Références
bibliographiques

Référence bibliographiques

- (1). B. Mayo, D.V. Sinderen, M. Ventura. Genome analysis of food grade lactic acid-producing bacteria: from basics to applications. *Current genomics*. (2008). 9(3): 169-183.
- (2). P.M. Moraes, M.L. Perin, A. Silva Júnior, A.L. Nero. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. (2013). 44(1): 109-112.
- (3). G. Adiguzel, M. Atasever. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Turkish dry fermented sausage. *Romanian Biotechnological Letters*. (2009). 14(1): 4130-4138.
- (4). S. Drouault, G. Corthier. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research*. (2001). 32(2): 101-117.
- (5). E. Pessione. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. (2012). 2: 86.
- (6). J.A. Reis, A.T. Paula, S.N. Casarotti. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*. (2012). 4: 124–140.
- (7). M. Kathiriya, V. Sreeja, S. Hati, J.B. Prajapati. Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milks by in vitro study. *International Journal of Fermented Foods*. (2015). 4(1-2): 61-72.
- (8). M.R. Kathiriya, J.B. Prajapati, S. Hati, Y.V. Vekariya. Significance of growth rate, acceptability of fermented milk and release of peptides by lactic cultures. *Research & Reviews: Journal of Dairy Science and Technology*. (2018). 5(1): 31-40.
- (9). M.E. Stiles, W.H. Holzapfel. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*. (1997). 36(1): 1-29.
- (10). A. Endo, S. Maeno, Y. Tanizawa, W. Kneifel, M. Arita, L. Dicks, S. Salminen. Fructophilic lactic acid bacteria, a unique group of fructose-fermenting microbes. *Applied and environmental microbiology*. (2018). 84 (19): e01290-18.
- (11). C. Dortu, P. Thonart. Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. (2009). 13(1): 349-356.
- (12). K. Suzuki, S. Asano, K. Iijima, K. Kitamoto. Sake and beer spoilage lactic acid bacteria—a review. *Journal of the Institute of Brewing*. (2008). 114(3): 209-223.
- (13). P. Horvath, A.C. Coûté-Monvoisin, D.A. Romero, P. Boyaval, C. Fremaux, R. Barrangou. Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *International journal of food microbiology*. (2009). 131(1): 62-70.

- (14). M.P. Mokoena. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*. (2017). 22(8): 1255.
- (15). T. Bintsis. Lactic acid Bacteria as starter cultures: an update in their metabolism and genetics. *AIMS microbiology*. (2018). 4(4): 665–684.
- (16). G. Reddy, M.D. Altaf, B.J. Naveena, M. Venkateshwar, E.V. Kumar. Amyolytic bacterial lactic acid fermentation—a review. *Biotechnology advances*. (2008). 26(1): 22-34.
- (17). F.J. Carr, D. Chill, N. Maida. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*. (2002). 28(4): 281-370.
- (18). R. Jawan, M.E. Kasimin, S.N. Jalal, A.M. Faik, S. Abbasiliasi, A. Ariff. Isolation, characterisation and in vitro evaluation of bacteriocins-producing lactic acid bacteria from fermented products of Northern Borneo for their beneficial roles in food industry. *In Journal of Physics: Conference Series*. (2019). 1358 (1): 012020.
- (19). A.M. Rodas, S. Ferrer, I.Pardo. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*. (2003). 26(3): 412-422.
- (20). M.G. Gänzle. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*. (2015). 2: 106–117.
- (21). S. Fushinobu. Unique sugar metabolic pathways of bifidobacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. (2010). 74(12): 2374-2384.
- (22). Z. Sun, W. Zhang, C. Guo, X. Yang, W. Liu, Y. Wu, Y. Song, L.Y. Kwok, Y. Cui, B. Menghe. R. Yang, L. Hu, H. Zhang. Comparative genomic analysis of 45 type strains of the genus *Bifidobacterium*: a snapshot of its genetic diversity and evolution. *PLoS One*. (2015). 10(2): e0117912.
- (23). Z. Radulović, J. Miočinović, P. Pudja, M. Barać, Z. Miloradović, D. Paunović, D. Obradović. The application of autochthonous lactic acid bacteria in white brined cheese production. *Mljekarstvo: časopis za naprednu proizvodnju i preradu mlijeka*. (2011). 61(1): 15-25.
- (24). C. Chen, S. Zhao, G. Hao, H. Yu, H. Tian, G. Zhao. Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *International journal of food properties*. (2017). 20(sup1): S316-S330.
- (25). G.I. Chammass, R. Saliba, G. Corrieu, C. Béal. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk “laban”. *International Journal of Food Microbiology*. (2006). 110(1): 52-61.

- (26). D.T.L. Nguyen, K. Van Hoorde, M. Cnockaert, E. De Brandt, K. De Bruyne, B.T. Le, P. Vandamme. A culture-dependent and-independent approach for the identification of lactic acid bacteria associated with the production of nemchua, a Vietnamese fermented meat product. *Food research international*. (2013). 50(1): 232-240.
- (27). P. Xu, J.M. Alves, T. Kitten, A. Brown, Z. Chen, L.S. Ozaki, P. Manque, X. Ge, M.G. Serrano, D. Puiu, S. Hendricks, Y. Wang, M.D. Chaplin, D. Akan, S. Paik, D.L. Peterson, F.L. Macrina, G.A. Buck. Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. *Journal of bacteriology*. (2007). 189(8): 3166-3175.
- (28). A.K. Jha, H.P. Bais, J.M. Vivanco. *Enterococcus faecalis* mammalian virulence-related factors exhibit potent pathogenicity in the *Arabidopsis thaliana* plant model. *Infection and immunity*. (2005). 73(1): 464-475.
- (29). W. Gao, B.P. Howden, T.P. Stinear. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Current opinion in microbiology*. (2018). 41: 76-82.
- (30). F. Rossi, C. Amadoro, G. Colavita. Members of the *Lactobacillus* genus complex (LGC) as opportunistic pathogens: A review. *Microorganisms*. (2019). 7(5): 126.
- (31). Y. Zhu, Y. Zhang, Y. Li. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (2009). 83(4): 597-610.
- (32). W.H. Holzapel, B.J. Wood. *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. First edition. (2014). 632.
- (33). F.P. Douillard, W.M. De Vos. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *In Microbial cell factories*. (2014). 13(1): 38.
- (34). K. Makarova, A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, et al., . Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (2006). 103(42): 15611-15616.
- (35). Y. Cui, T. Hu, X. Qu, L. Zhang, Z. Ding, A. Dong. Plasmids from food lactic acid bacteria: diversity, similarity, and new developments. *International journal of molecular sciences*. (2015). 16(6): 13172-13202.
- (36). J. Schroeter, T. Klaenhammer. Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS microbiology letters*. (2009). 292(1): 1-6.
- (37). F. Ghazi, D.E. Henni, Z. Benmechernene, M. Kihal. Phenotypic and whole cell protein analysis by SDS-PAGE for identification of dominant lactic acid bacteria isolated from Algerian raw milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. (2009). 4(1): 78-87.

- (38). W.H.N. Holzapfel, B.J. Wood. The genera of lactic acid bacteria. Springer Science & Business Media. First edition. United Kingdom: B.J.B. Wood, Germany: W.H. Holzapfel. (1995). 398
- (39). G.K.Y. Limsowtin, M.C. Broome, I.B. Powell. Lactic acid bacteria, taxonomy. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. (2002). 1470–1478.
- (40). L. Axelsson. Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker*. (2004). 139: 1-66.
- (41). W.H. Holzapfel, P. Haberler, R. Geisen, J. Björkroth, U. Schillinger. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*. (2001). 73(2): 365-373.
- (42). F. Pontigo, M. Moraga, S.V. Flores. Molecular phylogeny and a taxonomic proposal for the genus *Streptococcus*. *Genetics and Molecular Research*. (2015). 14 (3): 10905-10918.
- (43). T. Mas-De-Xaxars, L.J. Garcia-Gil. Detection and identification of unknown streptococcal populations in clinical samples. *Microbial Ecology in Health and Disease*. (2009). 21(3-4): 233-240.
- (44). V. Martín, P. Mediano, R. Campo, J.M. Rodríguez, M. Marín. Streptococcal diversity of human milk and comparison of different methods for the taxonomic identification of streptococci. *Journal of Human Lactation*. (2016). 32(4): 84-94.
- (45). O. Uriot, S. Denis, M. Junjua, Y. Roussel, A. Dary-Mourot, S. Blanquet-Diot. *Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate. *Journal of Functional Foods*. (2017). 37: 74-89.
- (46). C. Delorme. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International journal of food microbiology*. (2008). 126(3) : 274-277.
- (47). T. Parks, L. Barrett, N. Jones. Invasive streptococcal disease: a review for clinicians. *British medical bulletin*. (2015). 115(1):1–13.
- (48). X.Y. Gao, X.Y. Zhi, H.W. Li, H.P. Klenk, W.J. Li. Comparative genomics of the bacterial genus *Streptococcus* illuminates evolutionary implications of species groups. *PLoS one*. (2014). 9(6): 1-12.
- (49). E. Lerat, H. Ochman, Recognizing the pseudogenes in bacterial genomes. *Nucleic acids research*. (2005). 33(10): 3125-3132.
- (50). P.V. Shelyakin, O.O. Bochkareva, A.A. Karan, M.S. Gelfand. Micro-evolution of three *Streptococcus* species: selection, antigenic variation, and horizontal gene inflow. *BMC evolutionary biology*. 19(1): 1-15.

- (51). V.P. Richards, S.R. Palmer, P.D. Pavinski Bitar, X. Qin, G.M. Weinstock, S.K. Highlander, C.D. Town, R.A. Burne, M.G. Stanhope. Phylogenomics and the dynamic genome evolution of the genus *Streptococcus*. *Genome biology and evolution*. (2014). 6(4): 741-753.
- (52). J. Bergey. *Bergey's manual of systematic bacteriology : The Firmicutes*. Second edition. Georgia : P. de Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, Rainey, K.H Schleifer, F.A Rainey, W.B Whitman. (2009).
- (53). S.M. McBride, V.A. Fischetti, D.J. LeBlanc, R.C. Moellering Jr, M.S. Gilmore. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PloS one*. (2007). 2(7): 1-22.
- (54). M. García-Solache, L.B. Rice.. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clinical microbiology reviews*. (2019). 32(2): 1-28.
- (55). K. Fisher, C. Phillips. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. (2009). 155(6): 1749-1757.
- (56). A. Philippon, C. Poyart. Autres coques à Gram positif catalase négative d'intérêt médical : *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. *EMC - Biologie Médicale*. (2008). 3(1): 1–11.
- (57). L. Dicks, A. Endo. The Family Lactobacillaceae: Genera Other than *Lactobacillus*. *The Prokaryotes*. (2014). 203–212.
- (58). E.A. Pfeiler, T.R. Klaenhammer. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in microbiology*. (2007). 15(12): 546-553.
- (59). C.M. Dobson, H. Deneer, S. Lee, S. Hemmingsen, S. Glaze, B. Ziola. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus clausenii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. (2002). 52(6): 2003-2010.
- (60). R. Kant, J. Blom, A. Palva, R.J. Siezen, W.M. de Vos. Comparative genomics of *Lactobacillus*. *Microbial biotechnology*. (2011). 4(3): 323-332.
- (61). E. Salvetti, S. Torriani, G.E. Felis, The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and antimicrobial proteins*. (2012). 4 (4): 217-226.
- (62). A. Savadogo, A.S. Traore. La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. (2011). 5(5): 2057-2075.
- (63). P. Tailliez. Les lactobacilles : propriétés, habitats,rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques*. (2004). 6(1): 35–41.

- (64). F. Bottacini, D. Medini, A. Pavesi, F. Turrone, E. Foroni, D. Riley, V. Giubellini, H. Tettelin, D.v. Sinderen, M. Ventura. Comparative genomics of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology*. (2010). 156(11): 3243-3254.
- (65). F. Turrone, V.D.Sinderen, M. Ventura. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International journal of food microbiology*. (2011). 149(1): 37-44.
- (66). Z. Matejcková, E. Vlková, D. Liptáková, L. Valík. Preliminary Screening of Growth and Viability of 10 Strains of *Bifidobacterium* spp.: Effect of Media Composition. *Fermentation*. (2019). 5(2): 38.
- (67). E .Rodríguez, A. Peirotén, J.M. Landete, M. Medina, J.L Arqués. Gut catalase-positive bacteria cross-protect adjacent *Bifidobacteria* from oxidative stress. *Microbes and environments*. (2015). 30(3): 270-272.
- (68). K.Y. Lee, J.S. So, T.R. Heo. Thin layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of bifidobacteria at genus level. *Journal of Microbiological Methods*. (2001). 45(1): 1-6.
- (69). C. Milani, G. A. Lugli, S. Duranti, F. Turrone, F. Bottacini, M. Mangifesta, B. Sanchez, A. Viappiani, L. Mancabelli, B. Taminiau, V. Delcenserie, R. Barrangou, A. Margolles, D.V. Sinderen, M. Ventura. Genomic encyclopedia of type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Applied and environmental microbiology*. (2014). 80(20): 6290-6302.
- (70). Z. Sun, A. Baur, D. Zhurina, J. Yuan, C.U. Riedela. Accessing the inaccessible: molecular tools for bifidobacteria. *Applied and environmental microbiology*. (2012). 78(15): 5035-5042.
- (71). F. Bottacini, M.O.C. Motherway, E. Casey, B. McDonnell, J. Mahony, M. Ventura, D.V. Sinderena. Discovery of a conjugative megaplasmid in *Bifidobacterium breve*. *Applied and environmental microbiology*. (2015). 81(1): 166-176.
- (72). D.S. Yu, H. Jeong, D.H. Lee, S.K .Kwon, J.Y. Song, B. K Kim, M.S. Park, G.E .Ji, T.K. Oh, J.F. Kim. Complete genome sequence of the probiotic bacterium *Bifidobacterium bifidum* strain BGN4. *Journal of Bacteriology*. (2012). 194(17) : 4757– 4758.
- (73). G. Klein, A. Pack, C. Bonaparte, G. Reuter. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*. (1998). 41(2): 103-125.
- (74). A. Badis, N. Laouabdia-Sellami, D. Guetarni , M. Kihal , R. Ouzrout. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolé à partir de lait cru de chèvre de deux population caprines locale " ARABIA ET KABYLE". *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*. (2005). 23: 30-37.

- (75). M.A. Ehrmann, R.F. Vogel. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology*. (2005). 16(1-3): 31-42.
- (76). D. Mohania, V.K. Kansal, D. Shah, R. Nagpal, M. Kumar, S.K. Gautam, B.Singh, P.V. Behare. Therapeutic effect of probiotic dahi on plasma, aortic, and hepatic lipid profile of hypercholesterolemic rats. *Journal of Cardiovascular pharmacology and Therapeutics*. (2013). 18(5): 490-497.
- (77). I. Fguiri, M. Ziadi, M. Atigui, S. Arroum, T. Khorchani. Biochemical and molecular identification of lactic acid bacteria isolated from camel milk in Tunisia. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. (2015). 27: 716-720.
- (78). D. Mohania, R. Nagpal, M. Kumar, A. Bhardwaj, M. Yadav, S. Jain, F. Marotta , V. Singh, O. Parkash , H. Yadav. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of digestive Diseases*. (2008). 9(4): 190-198.
- (79). S.G. Botina , Y.D. Tsygankov, V.V. Sukhodolets,. Identification of industrial strains of lactic acid bacteria by methods of molecular genetic typing. *Russian Journal of Genetics*. (2006). 42(12): 1367-1379.
- (80). R. Temmerman, G. Huys, J. Swings. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology*. (2004). 15 (7-8): 348-359.
- (81). B. Martínez, A. Rodríguez, S. Kulakauskas, M.P. Chapot-Chartier. Cell wall homeostasis in lactic acid bacteria: threats and defences. *FEMS Microbiology Reviews*. (2020). 44: 538–564.
- (82). J. Burgain, J. Scher, G. Francius, F. Borges, M. Corgneau, A.M. Revol-Junelles, C. Cailliez-Grimal, C. Gaiani. Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in colloid and interface science*. (2014). 213: 21-35.
- (83). A.L. Lovering, S.S. Safadi, N.C. Strynadka. Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annual review of biochemistry*. (2012). 81: 451-478.
- (84). M. P. Chapot-Chartier, S. Kulakauskas. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial cell factories*. (2014). 13(S1): S9.
- (85). J.D. Chang, E.E. Foster, A.G. Wallace, S.J. Kim. Peptidoglycan O-acetylation increases in response to vancomycin treatment in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Scientific reports*. (2017). 7: 46500.
- (86). E. Bernard, T. Rolain, P. Courtin, A. Guillot, P. Langella, P. Hols, M.P. Chapot-Chartier. Characterization of O-acetylation of N-acetylglucosamine a novel structural

variation of bacterial peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*. (2011). 286(27): 23950-23958.

(87). T. Shiraishi, S. YOKOTA, S. Fukiya, A. Yokota. Structural diversity and biological significance of lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria: focusing on beneficial probiotic lactic acid bacteria. *Bioscience of microbiota, food and health*. (2016). 35(4): 147-161.

(88). O. Schneewind, D. Missiakas. Lipoteichoic acids, phosphate-containing polymers in the envelope of gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology*. (2014). 196(6): 1133-1142.

(89). S. Tomita, K. Furihata, T. Nukada, E. Satoh, T. Uchimura, S. Okada. Structures of two monomeric units of teichoic acid prepared from the cell wall of *Lactobacillus plantarum* NRIC 1068. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. (2009). 73(3): 530-535.

(90). S.M. Desmarais, C. Tropini, A. Miguel, F. Cava, R.D. Monds, M.A. de Pedro, K.C. Huang. High-throughput, highly sensitive analyses of bacterial morphogenesis using ultra performance liquid chromatography. *Journal of biological Chemistry*. (2015). 290(52) : 31090-31100.

(91). S.M. Desmarais, M.A. De Pedro, F. Cava, K.C. Huang. Peptidoglycan at its peaks: how chromatographic analyses can reveal bacterial cell wall structure and assembly. *Molecular microbiology*. (2013). 89(1): 1-13.

(92). S. K. Bhardwaj, K. Dwivedia, D.D. Agarwala. A review: HPLC method development and validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*. (2015). 5(4): 76-81.

(93). R.E. Schaub, J.P. Dillard. Digestion of peptidoglycan and analysis of soluble fragments. *Bio-protocol*. (2017). 7(15): e2438.

(94). Y. Wang, W.R. Baeyens, C. Huang, G. Fei, L. He, J. Ouyang. Enhanced separation of seven quinolones by capillary electrophoresis with silica nanoparticles as additive. *Talanta*. (2009). 77(5): 1667-1674.

(95). C.H. Ramesh, R. Mohanraju, S. Narayana, K.N. Murthy, P. Karthick. Isolation and cellular fatty acid profile analyzation of two marine bioluminescent bacteria. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*. (2017). 46(1):192-195.

(96). S. Cakmakci, E. Dagdemir, A.A. Hayaloglu, M. Gurses, E. Gundogdu. Influence of ripening container on the lactic acid bacteria population in Tulum cheese. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. (2008). 24(3): 293-299.

(97). X.J. Liu, F. Chen, Y. Jiang. Differentiation of *Nostoc* flagelliforme and its neighboring species using fatty acid profiling as a chemotaxonomic tool. *Current microbiology*. (2003). 47(6): 467-474.

- (98). Y. Zou, F. Liu, C. Fang, D. Wan, R. Yang, Q. Su, R. Yang, J. Zhao. *Lactobacillus shenzhenensis* sp. nov., isolated from a fermented dairy beverage. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, (2013). 63(5): 1817-1823.
- (99). H. Kimoto-Nira, M. Kobayashi, M. Nomura, K. Sasaki, C. Suzuki. Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition: analysis by using different growth media. *International journal of food microbiology*. (2009). 131(2-3):183-188.
- (100). C. Li, L. B. Liu, N. Liu. Effects of carbon sources and lipids on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* in growth media. *Annals of microbiology*. (2012). 62(3) : 949-956.
- (101). C. Cuvelier, J.F. Cabaraux, I. Dufrasne, J.L. Hornick, L. Istasse. Acides gras: nomenclature et sources alimentaires. In *Annales de Médecine Vétérinaire* . (2004). 148(3) : 133-140.
- (102). M.E. Schutter, P.R. Dick. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. *Soil Science Society of America Journal*. (2000). 64(5): 1659-1668.
- (103). M. Sasser . Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *Journal of oceanography*. (1990). 52(1): 1-15.
- (104). F. Zakhia, P. de Lajudie. La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques— application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Canadian journal of microbiology*. (2006). 52(3): 169-181.
- (105). M.J. Benito, M.J. Serradilla, S. Ruiz-Moyano, A. Martín, F. Pérez-Nevado, M.G. Córdoba. Rapid differentiation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science*. (2008). 80(3): 656-661.
- (106). A.R. Graybosch, R. Morris. An improved SDS-PAGE method for the analysis of wheat endosperm storage proteins. *Journal of Cereal Science*. (1990). 11(3): 201-212.
- (107). P. Piraino, A. Ricciardi, G. Salzano, T. Zotta, E. Parente. Use of unsupervised and supervised artificial neural networks for the identification of lactic acid bacteria on the basis of SDS-PAGE patterns of whole cell proteins. *Journal of microbiological methods*. (2006). 66(2): 336-346.
- (108). I. Sánchez, S. Seseña, L. Palop. Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of ‘Almagro’ eggplants by SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. *International journal of food microbiology*. (2003). 82(2): 181-189.

- (109). N.T.L. Doan, K. Van Hoorde, M. Cnockaert, E. De Brandt, M. Aerts, B. Le Thanh, P. Vandamme. Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. *Letters in applied microbiology*. (2012). 55(4): 265-273.
- (110). N. Singhal, M. Kumar, P.K. Kanaujia, J.S. Viridi. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*. (2015). 6: 791.
- (111). D. Stępień-Pyśniak, T. Hauschild, P. Róžański, A. Marek. MALDI-TOF mass spectrometry as a useful tool for identification of *Enterococcus* spp. from wild birds and differentiation of closely related species. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. (2017). 27(6): 1128-1137.
- (112). C. Jurinke, P. Oeth, D. Van den Boom. MALDI-TOF mass spectrometry. *Molecular biotechnology*. (2004). 26(2): 147-163.
- (113). S. Suarez, X. Nassif, A. Ferroni. Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique. *Pathologie Biologie*. (2015). 63(1): 43-52.
- (114). T.R. Sandrin, J.E. Goldstein, S. Schumaker. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass spectrometry reviews*. (2013). 32(3): 188-217.
- (115). T. García-Cayuela, T. Requena, M.C. Martínez-Cuesta, C. Peláez . Rapid detection of *Lactococcus lactis* isolates producing the lantibiotics nisin, lacticin 481 and lacticin 3147 using MALDI-TOF MS. *Journal of microbiological methods*. (2017). 139: 138-142.
- (116). N.L. Rose, P. Sporns, L.M. McMullen. Detection of bacteriocins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Applied and environmental microbiology*. (1999). 65(5): 2238-2242.
- (117). E. Carbonnelle, C. Mesquita, E. Bille, N. Day, B. Dauphin, J.L. Beretti, A. Ferroni, L. Gutmann, X. Nassif. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical biochemistry*. (2011). 44(1): 104-109.
- (118). K. Teramoto, L. Sun, H. Sato, M. Torimura, H. Tao, T. Shintani. Comparative Characterization of Ribosomal Proteins of Lactic Acid Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Journal mass spectrometry society of Japan*. (2008). 56(1): 1.
- (119). H. Sato, M. Torimura, M. Kitahara, M. Ohkuma, Y. Hotta, H. Tamura. Characterization of the *Lactobacillus casei* group based on the profiling of ribosomal proteins coded in S10-spc-alpha operons as observed by MALDI-TOF MS. *Systematic and applied microbiology*. (2012). 35(7): 447-454.

- (120). J. Rychert. Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. *Journal of Infectiology*. (2019). 2(4): 1-5
- (121). D.J.M. Mouwen, A. Hörman, H. Korkeala, A. Alvarez-Ordóñez, M. Prieto. Applying Fourier-transform infrared spectroscopy and chemometrics to the characterization and identification of lactic acid bacteria. *Vibrational Spectroscopy*. (2011). 56(2) : 193-201.
- (122). B. Dziuba, A. Babuchowski, D. Nałęcz, M. Niklewicz. Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. *International Dairy Journal*. (2007). 17(3): 183-189.
- (123). A.A. Baravkar, R.N. Kale, S.D. Sawant. FTIR Spectroscopy: principle, technique and mathematics. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. (2011). 2(1): 513-519.
- (124). C. Berthomieu, R. Hienerwadel. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis research*. (2009). 101(2-3):157-170.
- (125). P. Singh, M.K. Singh, Y.R. Beg. G.R. Nishad. A review on spectroscopic methods for determination of nitrite and nitrate in environmental samples. *Talanta*. (2019). 191: 364-381.
- (126). Y. Burgula, D. Khali, S. Kim, S.S. Krishnan, M.A. Cousin, J.P. Gore, B.L. Reuhs, L.J. Mauer. Review of mid-infrared Fourier transform-infrared spectroscopy applications for bacterial detection. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*. (2007). 15(2): 146-175.
- (127). F. Faghihzadeh, N.M. Anaya, L.A. Schifman, V. Oyanedel-Craver. Fourier transform infrared spectroscopy to assess molecular-level changes in microorganisms exposed to nanoparticles. *Nanotechnology for Environmental Engineering*. (2016). 1(1): 1-16.
- (128). J. Samelis, A. Bleicher, C. Delbès-Paus, A. Kakouri, K. Neuhaus, M.C. Montel. FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek Graviera cheese. *Food microbiology*. (2011). 28(1): 76-83.
- (129). L. Rossetti, G. Giraffa. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*. (2005). 63(2):135-144.
- (130). K.H. Schleifer, M. Ehrmann, C. Beimfohr, E. Brockmann, W. Ludwig, R. Amann. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. (1995). 5(8): 1081-1094.
- (131). H. Zmr, E. Bam, M. Mni, T. Nf, M. Amm. Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Dairy Product. *Food Science*. (2016). 5(12): 3221-3230
- (132). P. Ward, D. Roy. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Le Lait*. (2005). 85(1-2): 23-32.

- (133). N. Huybens, J. Mainil, D. Marlier. Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. In *Annales de Médecine Vétérinaire*. (2009).153(2) : 112-128.
- (134). J.L. Gremaud, C. Gehrig, S. Sabatasso, V. Castella. Identification génétique de personnes défuntes. *Revue Médicale Suisse*. (2008). 4(164): 1615-1618.
- (135). K. Van Hoorde, P. Vandamme, G. Huys. Molecular identification and typing of lactic acid bacteria associated with the production of two artisanal raw milk cheeses. *Dairy science & technology*. (2008). 88(4-5) : 445-455.
- (136). L. Anggraini, Y. Marlida, W. Wizna, J. Jamsari, M. Mirzah, F. Adzitey, N. Huda, Molecular identification and phylogenetic analysis of GABA-producing lactic acid bacteria isolated from indigenous dadih of West Sumatera. *Indonesia*. (2018). 7: 1663.
- (137). S. Singh, P. Goswami, R. Singh, K.J. Heller. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*. With a focus on discrimination between closely related species: A review. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie-Food Science and Technology*. (2009).42(2): 448-457.
- (138). R. Boom, C.J.A. Sol, M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-van Dillen, J. Van der Noordaa. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*. (1990). 28(3): 495-503.
- (139). C.A. Scherczinger, M.T. Bourke, C. Ladd, H.C. Lee. DNA extraction from liquid blood using QIAamp. *Journal of Forensic Science*. (1997). 42(5): 893-896.
- (140). R.J. Diefenbach, J.H. Lee, R.F. Kefford, H. Rizos. Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA. *Cancer genetics*. (2018). 228. 21-27.
- (141). G. Donelli, C. Vuotto, P. Mastromarino. Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. *Microbial ecology in health and disease*. (2013). 24(1): 20105.
- (142). ,H.X. Xu, Y. Kawamura, N. Li, L. Zhao, T.M. Li ,Y.Z. Li, S. Shu, T. Ezaki. A rapid method for determining the G+ C content of bacterial chromosomes by monitoring fluorescence intensity during DNA denaturation in a capillary tube. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. (2000). 50(4): 1463-1469.
- (143). S. Sonoki, S. Hisamatsu, A. Kiuchi. High-performance liquid chromatographic determination of DNA base composition with fluorescence detection. *Nucleic acids research*. (1993). 21(11): 2776.

- (144). J. Tamaoka, K. Komagata. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS microbiology letters*. (1984). 25(1): 125-128.
- (145). M. Mesbah, U. Premachandran, W.B. Whitman. Precise measurement of the G+ C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. (1989). 39(2): 159-167.
- (146). K.B. Amor, E.E. Vaughan, W.M de Vos. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *The Journal of nutrition*. (2007). 137(3): 741-747.
- (147). J. Goris, K.T. Konstantinidis, J.A. Klappenbach, T. Coenye, P. Vandamme, J.M. Tiedje, DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. (2007). 57(1): 81-91.
- (148). J.T. de Magalhães, A.P.T. Uetanabaro, C.A. de Moraes. Identification of *Lactobacillus* UFV H2b20 (probiotic strain) using DNA-DNA hybridization. *Brazilian Journal of Microbiology*. (2008). 39(3): 542-546.
- (149). B. Tilahun, A. Tesfaye, D. Muleta, A. Bahiru, Z. Terefework, G. Wessel. Isolation and molecular identification of lactic acid bacteria using 16s rRNA genes from fermented Teff (*Eragrostis tef* (Zucc.)) dough. *International journal of food science*. (2018). 2018: 8510620.
- (150). F. Castellucci. Outils de biologie moléculaire pour l'identification des bactéries lactiques du raisin et de vin. *Organisation internationale de la vigne et du vin*. (2012). 409: 1-13
- (151). T. Ahbrizal, S. Radu, A.R.A. Latif, A.R. Mutalib, G. Rusul, N. Elhadi. Random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Vibrio vulnificus* isolated from cockles and shrimps. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*. (2000). 7(1): 41-46.
- (152). A. Rementeria, L. Gallego, G. Quindos, J. Garaizar. Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. *Clinical Microbiology and Infection*. (2001). 7(6): 331-336.
- (153). J. Kaur, S. Lee, Y.S. Park, A. Sharma. RAPD analysis of *Leuconostoc mesenteroides* strains associated with vegetables and food products from Korea. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie-Food Science and Technology*. (2017). 77: 383-388.
- (154). I. Sanchez, S. Sesena, L.L. Palop. Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with 'Almagro' eggplants spontaneous fermentation, based on

combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis patterns. *Journal of Applied Microbiology*. (2004). 97(2): 446-458.

(155). L. Lopez-Canovas, M.B.M. Benitez, J.A.H. Isidron, E.F. Soto. Pulsed field gel electrophoresis: past, present, and future. *Analytical biochemistry*. (2019). 573: 17-29.

(156). A.I. Doulgeraki, S. Paramithiotis, D.M. Kagkli, G.J.E. Nychas. Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food microbiology*. (2010). 27(8): 1028-1034.

(157). K.E. Elberse, S. Nunes, R. Sá-Leão, H.G. van der Heide, L.M. Schouls. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: comparison with PFGE and MLST. *PloS one*. (2011). 6(5): 1-8.

(158). A. Sharma, S. Lee, Y.S. Park. Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology*. (2020). 29: 1-18.

(159). R.V. Goering. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution*. (2010). 10(7): 866-875.

(160). H.M. Neoh, X.E. Tan, H.F. Sapri, T.L. Tan. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution*. (2019). 10(2): 104-111.

(161). H.O. Hashim, M.B.S. Al-Shuhaib. Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: a review. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. (2019). 6(4): 137-144.

(162). S.H. Park, J.H. Jung, D.H. Seo, H.L. Lee, G.W. Kim, S.Y. Park, W.C. Shin, S. Hong, C.S. Park. Differentiation of lactic acid bacteria based on RFLP analysis of the *tuf* gene. *Food Science and Biotechnology*. (2012). 21(3): 911-915.

(163). A. Rohit, B. Maiti, S. Shenoy, I. Karunasagar. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for rapid diagnosis of neonatal sepsis. *The Indian journal of medical research*. (2016). 143(1): 72–78.

(164). A. Galal-Khallaf, K. Mohammed-Geba, A.G. Osman, K.Y. AbouelFadl, Y.J. Borrell, E. Garcia-Vazquez. SNP-based PCR-RFLP, T-RFLP and FINS methodologies for the identification of commercial fish species in Egypt. *Fisheries Research*. (2017). 185: 34-42.

(165). L.Y. Chuang, C.H. Yang, K.H. Tsui, Y.H. Cheng, P.L. Chang, C.H. Wen, H.W. Chang. Restriction enzyme mining for SNPs in genomes. *Anticancer Research*. (2008). 28(4A): 2001-2007.

- (166). A. Otlewska, M. Konopacka, P. Walczak. Differentiation between *Lactococcus* sp. and *Leuconostoc* sp. based on RFLP analysis of 16 S rRNA. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. (2010). 60(2): 133-138.
- (167). F.T. Tabit. Advantages and limitations of potential methods for the analysis of bacteria in milk: a review. *Journal of food science and technology*. (2016). 53(1): 42-49.
- (168). O. Claisse, V. Renouf, A. Lonvaud-Funel. Differentiation of wine lactic acid bacteria species based on RFLP analysis of a partial sequence of *rpoB* gene. *Journal of microbiological methods*. (2007). 69(2): 387-390.
- (169). A. Mancini, C. Lazzi, V. Bernini, E. Neviani, M. Gatti, Identification of dairy lactic acid bacteria by tRNA^{Ala}-23S rDNA-RFLP. *Journal of microbiological methods*. (2012). 91(3), 380-390.
- (170). I. Mainville, N. Robert, B. Lee, E.R. Farnworth. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. *Systematic and applied microbiology*. (2006). 29(1): 59-68.
- (171). J. Yu, Z. Sun, W. Liu, J. Zhang, T. Sun, Q. Bao, H. Zhang. Rapid identification of lactic acid bacteria isolated from home-made fermented milk in Tibet. *The Journal of general and applied microbiology*. (2009). 55(3):181-190.
- (172). Y.T. Kao, Y.S. Liu, Y.T. Shyu. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Research International*. (2007). 40(1): 71-79.
- (173). F. Uhel, L. Zafrani. Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Médecine Intensive Réanimation*. (2019). 28(6): 464-472.
- (174). M. Arya, I.S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, H.R. Patel. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*. (2005). 5(2): 209-219.
- (175). R.J. Schmidt, M.G. Emara, L. Kung Jr. The use of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay for identification and enumeration of *Lactobacillus buchneri* in silage. *Journal of applied microbiology*. (2008). 105(3): 920-929.
- (176). D. Ercolini, G. Moschetti, G. Blaiotta, S. Coppola. The potential of a polyphasic PCR-DGGE Approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Systematic and Applied Microbiology*. (2001). 24(4): 610-617.
- (177). L.S. Ahmadsah, E. Kim, Y.S. Jung, H.Y. Kim. Identification of LAB and fungi in Laru, a fermentation starter, by PCR-DGGE, SDS-PAGE, and MALDI-TOF MS. *Journal of microbiology and biotechnology*. (2018). 28(1): 32-39.

(178). Y. Hong, H.S. Yang, J. Li, S.K. Han, H.C. Chang, H.Y. Kim. Identification of lactic acid bacteria in salted Chinese cabbage by SDS-PAGE and PCR-DGGE. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. (2014). 94(2): 296-300.

(179). R. Ranjbar, A. Karami, S. Farshad, G.M. Giammanco, C. Mammina. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *The new microbiologica*. (2014). 37(1): 1-15.

(180). Y. Nami, B. Haghshenas, A.Y. Khosroushahi. Molecular identification and probiotic potential characterization of lactic acid bacteria isolated from human vaginal microbiota. *Advanced pharmaceutical bulletin*. (2018). 8(4): 683.

(181). A. Lauri, P.O. Mariani. Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. *Genes & nutrition*. (2009). 4(1): 1-12.

Membres de jury Présidente : M ^{me} . W. Benhamada Examinatrice : Dr. S. Alioua Encadreur : Mr .Y. Rahmoune	Identification phénotypique et moléculaire des bactéries lactiques Année Universitaire : 2019 - 2020	Présenté par Benhamada Amina Boudjerida Kaouter Mati Amira
--	---	--

Résumé :

L'objectif de ce travail est de donner une idée sur les méthodes de l'identification phénotypique et moléculaire des bactéries lactiques.

Les bactéries lactiques ont acquis une grande importance par leurs différentes propriétés technologiques. Leur identification phénotypique est basée sur l'étude des différents caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques par l'analyse de la composition de la paroi cellulaire, des acides gras, etc. Les méthodes les plus utilisées sont SDS-PAGE, FTIR et MALDI-TOF-MS, mais leurs utilisations restent limitées car elles prennent beaucoup de temps et présentent plusieurs inconvénients.

Dernièrement, des méthodes moléculaires très sensibles, rapides et automatisées ont été introduites pour la détection et l'identification des bactéries lactiques cultivables et non cultivables. Elles se basent sur l'analyse des acides nucléiques comme l'hybridation ADN-ADN, l'analyse de séquence d'ADNr 16S, l'hybridation avec une sonde spécifique, l'analyse RFLP et le ribotyping, etc.

Mots clés : Bactéries lactiques, phénotypique, moléculaire, Hybridation ADN-ADN, ADNr 16S.

Abstract:

The objective of this work is to give an idea of the methods of phenotypic and molecular identification of lactic acid bacteria.

Lactic bacteria have acquired great importance due to their different technological properties. Their phenotypic identification is based on the study of different morphological, physiological and biochemical characters by analyzing the composition of the cell wall, fatty acids, etc. The most used methods are SDS-PAGE, FTIR and MALDI-TOF-MS, but their uses remain limited because they take a lot of time and have several drawbacks.

Recently, highly sensitive, rapid and automated molecular methods have been introduced for the detection and identification of cultivable and non-cultivable lactic acid bacteria. They are based on the analysis of nucleic acids such as DNA-DNA hybridization, 16S rDNA sequence analysis, hybridization with a specific probe, RFLP analysis and ribotyping, etc.

Key words : lactic acid bacteria ,phenotypic , molecular, DNA-DNA hybridization , 16S rDNA .

الهدف من هذا العمل هو إعطاء فكرة عن طرق التعرف الظاهري و الجزيئي لبكتيريا حمض اللاكتيك. اكتسبت بكتيريا اللاكتيك أهمية كبيرة بسبب خصائصها التكنولوجية المختلفة ويعتمد تحديدها باستخدام نمطها الظاهري على دراسة الخصائص المورفولوجية والفسولوجية والكيميائية الحيوية المختلفة لهذة البكتيريا من خلال تحليل تكوين جدار الخلية والأحماض الدهنية وما إلى ذلك. الطرق الأكثر استخداما هي SDS PAGE , FTIR , MALDI-TOF-MS. لكن استخداماتها لا تزال محدودة لأنها تستغرق وقتاً طويلاً ولها عيوب عديدة. في الآونة الأخيرة ، تم إدخال طرق جزيئية عالية الحساسية وسريعة وآلية لاكتشاف وتحديد بكتيريا حمض اللاكتيك القابلة للزراعة وغير القابلة للزراعة. وهي تستند إلى تحليل الأحماض النووية مثل تهجين الحمض النووي DNA- DNA ، وتحليل تسلسل S16 DNAr ، والتهجين بمسبار محدد ، وتحليل RFLP والنمذجة الربيبية ، إلخ.

الكلمات الدالة: بكتيريا حمض اللاكتيك , النمط الظاهري, النمط الجزيئي , تهجين الحمض النووي , ADNr16.