

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des sciences alimentaires

THESE DE DOCTORAT

En sciences alimentaires

Spécialité : Nutrition et pathologie

PROBIOTIQUES AUTOCHTONES ISOLÉS DE LAIT CRU : ÉVALUATION DE
L'INNOCUITÉ ET DU POTENTIEL FONCTIONNEL

Par

Mohamed Amine HAMMADECHE

Devant le jury composé de :

S. MEGATELI	Professeur, U. de blida 1., Blida	Président
A. DOUMANDJI	Professeur, U. de blida 1., Blida	Directrice de thèse
N. MADI	Maitre de recherche A, CRTAA., Bejaia.	Co-directeur de thèse
D. MOKRANI	Maitre de conférences A, U. de Boumerdes	Examineur
Z. AMROUCHE	Maitre de conférences A, U. de Khemis Miliana	Examineur
H. KHALDOUN	Professeur, U. de Blida 1., Blida	Examinatrice

Blida, 2025

RESUME

Dans cette étude, 172 isolats bactériens ont été obtenus à partir de lait cru d'origine animale collecté dans différentes régions d'Algérie. Parmi eux, 103 ont été identifiés comme bactéries lactiques présomptives, et 82 ont présenté une activité antibactérienne contre quatre pathogènes alimentaires (deux Gram-positifs et deux Gram-négatifs). Douze isolats ont montré une activité inhibitrice marquée (diamètre > 17,5 mm).

L'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF MS a révélé que les souches sélectionnées appartenaient à deux espèces : *Enterococcus faecium* (6 souches) et *Lactococcus lactis ssp. lactis* (6 souches). L'évaluation phénotypique de leur sécurité a montré une sensibilité globale aux antibiotiques testés et l'absence d'activités hémolytique, DNase et gélatinase. En revanche, les souches d'*E. faecium* ont produit de la tyramine, et trois d'entre elles (LMBMR23, LMBMR28 et LVBBR25) ont également formé de l'histamine.

Sur le plan fonctionnel, les souches d'*E. faecium* ont démontré une meilleure résistance à l'acidité (pH 2 et 1,5) et aux sels biliaires. Cinq souches présentant un taux de survie supérieur à 38 % après 3 h à pH 2 ont été retenues et soumises à une réidentification par séquençage du gène 16S rRNA. Aucun gène de virulence ni de résistance à la vancomycine n'a été détecté par PCR. Parmi les souches sélectionnées, LMMDR27, LMMDR16 et LVBBR13 ont présenté les meilleures propriétés d'auto-agrégation, d'hydrophobicité, et un profil fermentaire diversifié (API 50 CH).

Ces trois souches d'*Enterococcus faecium* ont été identifiées comme candidates probiotiques prometteuses, à valider par des études *in vivo* pour des applications fonctionnelles en sécurité alimentaire et en santé humaine.

Mots-clés : Lait cru ; Bactéries lactiques ; Activité antibactérienne ; Innocuité ; Probiotiques ; *Enterococcus faecium*.

ABSTRACT

Title: Indigenous Probiotics Isolated from Raw Milk: Assessment of Safety and Functional Potential

In this study, 172 bacterial isolates were obtained from raw milk of animal origin collected in various regions of Algeria. Among them, 103 were presumptively identified as lactic acid bacteria, and 82 exhibited antibacterial activity against four foodborne pathogens (two Gram-positive and two Gram-negative). Twelve isolates showed marked inhibitory activity (inhibition zone diameter > 17.5 mm).

Identification using MALDI-TOF MS mass spectrometry revealed that the selected strains belonged to two species: *Enterococcus faecium* (6 strains) and *Lactococcus lactis ssp. lactis* (6 strains). Phenotypic safety assessment indicated overall sensitivity to the tested antibiotics and absence of hemolytic, DNase, and gelatinase activities. However, *E. faecium* strains produced tyramine, and three of them (LMBMR23, LMBMR28, and LVBBR25) also formed histamine.

Functionally, *E. faecium* strains demonstrated better resistance to acidic conditions (pH 2 and 1.5) and bile salts. Five strains showing a survival rate above 38% after 3 hours at pH 2 were retained and reidentified by 16S rRNA gene sequencing. No virulence or vancomycin resistance genes were detected by PCR. Among the selected strains, LMMDR27, LMMDR16, and LVBBR13 exhibited the highest levels of auto-aggregation, hydrophobicity, and diverse sugar fermentation profiles (API 50 CH).

These three *Enterococcus faecium* strains were identified as promising probiotic candidates, to be validated through *in vivo* studies for potential functional applications in food safety and human health.

Keywords: Raw milk; Lactic acid bacteria; Antibacterial activity; Safety; Probiotics; *Enterococcus faecium*.

الملخص

العنوان: بروبيوتيك محلية العزل من الحليب الخام: دراسة تقييمية للسلامة والإمكانات الوظيفية.

في هذه الدراسة، تم الحصول على 172 عينة بكتيرية من الحليب الخام من أصل حيواني تم جمعه من مناطق مختلفة في الجزائر. من بينها، تم تحديد 103 عينة على أنها بكتيريا حمض اللاكتيك، وأظهرت 82 منها نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد أربعة مسببات الأمراض المنقولة بالغذاء (اثنتان من النوع إيجابي الجرام واثنتان من النوع سلبي الجرام). أظهرت 12 بما في ذلك نشاطاً مثبطاً ملحوظاً، حيث تجاوز قطر منطقة التثبيط 17.5 ملم.

كشفت عملية التحديد السلالي باستخدام مطياف الكتلة من نوع MALDI-TOF MS أن السلالات المختارة تنتمي إلى نوعين: *Enterococcus faecium* (6 سلالات) و *Lactococcus lactis ssp. lactis* (6 سلالات). وأشار تقييم السلامة الظاهرية إلى حساسية عامة لأغلب المضادات الحيوية المختبرة وغياب أنشطة انحلال كريات الدم الحمراء و DNase و الجيلاتيناز. ومع ذلك، أنتجت سلالات *E. faecium* التيرامين، كما شكلت ثلاث منها (LMBMR23 و LMBMR28 و LVBBR25) الهستامين أيضاً.

من الناحية الوظيفية، أظهرت سلالات *E. faecium* مقاومة أفضل للظروف الحمضية (pH 2 و 1.5) والأملاح الصفراء. تم الاحتفاظ بخمس سلالات أظهرت معدل بقاء أعلى من 38% بعد 3 ساعات عند pH 2 وأعيد تحديدها السلالي عن طريق تسلسل جين 16S ARNr. لم يتم الكشف عن أي جينات ضراوة أو مقاومة للفاونكوميسين بواسطة PCR. من بين السلالات المختارة، أظهرت LMMDR27 و LMMDR16 و LVBBR13 أعلى مستويات من التجميع الذاتي والكراهية للماء. بالإضافة إلى تنوع في الملف التخميري للسكريات حسب اختبار API 50 CH

تم تحديد هذه العينات الثلاثة من *Enterococcus faecium* كمرشحات واعدة للاستخدام كبروبيوتيكات، وينبغي التحقق من فعاليتها من خلال الدراسات الحية، لاستخدامات وظيفية في مجال السلامة الغذائية وصحة الإنسان.

الكلمات المفتاحية : الحليب الخام؛ بكتيريا حمض اللاكتيك؛ النشاط المضاد للبكتيريا؛ السلامة الغذائية؛ البروبيوتيك؛ *Enterococcus faecium*.

REMERCIEMENTS

Aucun travail d'une telle envergure n'aurait pu aboutir sans la volonté et l'aide d'Allah, le Tout-Puissant. Je Lui exprime ma plus profonde gratitude pour m'avoir accordé la force, la patience et la persévérance nécessaires tout au long de ces années d'études et de recherche. Grâce à Sa guidance, j'ai pu surmonter les défis, rester constant dans l'effort et mener à bien ce projet de thèse. Que cette réussite soit le témoignage de Ses bienfaits, et qu'Il continue de me guider dans mes futures démarches académiques et professionnelles.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude aux membres du jury pour le temps et l'attention qu'ils ont consacrés à l'évaluation de cette thèse. Mes remerciements particuliers vont à Monsieur MEGATELI Smain, Professeur à l'Université de Blida 1, pour avoir accepté de présider ce jury. J'adresse également mes remerciements à Monsieur MOKRANI Djamal, Maître de conférences A à l'Université de Boumerdes, Monsieur AMROUCHE Zoheir, Maître de conférences A à l'Université de Khemis Miliana et Madame KHALDOUN Hassina, Professeur à l'Université de Blida 1, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance la plus sincère à ma Directrice de thèse, Madame DOUMANDJI Amel, Professeur à l'Université de Blida 1, pour la confiance qu'elle m'a témoignée en me permettant de conduire ce travail de recherche avec autonomie et responsabilité.

J'adresse également mes sincères remerciements à mon co-directeur de thèse, Monsieur MADI Nassim, Maître de recherche A au Centre de Recherche en Technologies Agro-Alimentaires de Bejaia. Je lui suis profondément reconnaissant pour m'avoir initié à la rigueur scientifique et transmis la passion de la recherche. Son accompagnement attentif, ses conseils avisés, sa disponibilité constante, ainsi que sa bienveillance, ses encouragements et sa grande modestie ont constitué pour moi une source inestimable d'inspiration et de motivation tout au long de ce travail.

Je remercie également :

Le Professeur MEGATELI Smain, président du comité de formation doctorale, pour son aide précieuse, ses conseils éclairés et son soutien dans la gestion des démarches administratives.

Les Professeurs RAMDANE Sidali et AOUES Karima pour leur bienveillance, leur soutien indéfectible et leurs encouragements tout au long de mon parcours. Je leur souhaite, ainsi qu'à leur famille, bonheur et réussite.

Monsieur TEFFAHI Djamel, Chef de service du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida, pour m'avoir accueilli dans son établissement, mis à disposition les équipements nécessaires et offert un environnement de travail serein.

L'équipe du C.R.Bt, pour m'avoir accueilli et soutenu lors de la réalisation d'une partie de cette thèse, ainsi que pour leur gentillesse et leur collaboration.

Monsieur BENMAALEM Abderrahmane, Madame KARA Amel et Madame HALOUANE, ainsi qu'à leurs équipes respectives, pour leur soutien logistique, leur disponibilité et pour m'avoir ouvert l'accès à leurs laboratoires afin de mener à bien certaines étapes de ce travail.

Enfin, à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, je tiens à exprimer ici toute ma reconnaissance et ma gratitude.

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents, en reconnaissance de leurs sacrifices, de l'éducation qu'ils m'ont transmise et de leur soutien indéfectible. Ils sont la source de ma joie, de mon bonheur et de ma sérénité. Que Dieu les protège et leur accorde une longue vie, afin qu'ils puissent partager d'autres moments de bonheur à mes côtés.

Mes frères Sofiane, Salim et Hakim, mes sœurs et ma belle-sœur, pour leur présence constante, leur soutien sous toutes ses formes et leur rôle de véritables piliers dans ma vie.
Que Dieu protège leurs familles.

Mes neveux et nièces, qui sont pour moi une source de réconfort et de motivation. Je leur souhaite pleine réussite dans leur parcours académique et personnel.

Mes amis Abdallah AISSANI, Amine DAOUADJI et Yaakoub KEBILA, pour leur amitié sincère et leur soutien durant les périodes de stress et de doute.

Mes collègues de laboratoire rencontrés au cours de ce doctorat, qui ont été une seconde famille et avec qui j'ai partagé de précieux échanges scientifiques et humains : Dr SEBSI Abderrahmane, Dr BOUTEKFA Yacine et Dr HENNI Fatima Zohra.

Mohamed Amine

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
ABSTRACT	2
الملخص	3
REMERCIEMENTS	4
DEDICACES	5
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	10
INTRODUCTION	13
1 GÉNÉRALITÉ SUR LES BACTÉRIES LACTIQUES	15
1.1 Historique et découverte	15
1.2 Taxonomie	15
1.2.1 <i>Lactobacillus</i>	16
1.2.2 <i>Paralactobacillus</i>	16
1.2.3 <i>Pediococcus</i>	16
1.2.4 <i>Enterococcus</i>	16
1.2.5 <i>Leuconostoc</i>	17
1.2.6 <i>Weissella</i>	17
1.2.7 <i>Streptococcus</i>	17
1.2.8 <i>Lactococcus</i>	18
1.3 Habitats	18
1.4 Types fermentaires	19
1.4.1 Bactéries homofermentaires obligatoires	19
1.4.2 Bactéries homo-hétérofermentaires facultatives	20
1.4.3 Bactéries hétérofermentaires obligatoires	21
1.5 Métabolites générés par les bactéries lactiques	22
1.5.1 Acides organiques	22
1.5.2 Peroxyde d'Hydrogène (H ₂ O ₂)	22
1.5.3 Dioxyde de carbone (CO ₂)	22
1.5.4 Vitamines	23
1.5.5 Exopolysaccharides	23
1.5.6 Acide Gamma-Aminobutyrique (GABA)	23
1.5.7 Substances aromatiques	23
1.5.8 Composés antioxydants	23
1.5.9 Bactériocines	24
1.5.9.1 Classification des bactériocines	24
1.5.9.1.1 Lantibiotiques	24
1.5.9.1.2 Non Lantibiotiques	24
1.5.9.1.3 Bactériolysines	25
1.6 Mise en évidence des bactéries lactiques	25

1.6.1 Méthodes phénotypiques	25
1.6.2 Méthodes moléculaires	26
1.6.2.1 Approche protéomique (MALDI-TOF)	26
1.6.2.2 Approche génotypique	26
1.7 Maintenance des bactéries lactiques	28
1.8 Innocuité des bactéries lactiques	28
2 POTENTIEL FONCTIONNEL ET TECHNOLOGIQUE DES BACTERIES LACTIQUES.	29
2.1 Rôle des bactéries lactiques dans la santé humaine	29
2.1.1 Définition et critères des probiotiques	29
2.1.2 Microbiote intestinal et probiotiques	31
2.1.3 Effets des probiotiques sur la santé digestive	34
2.1.3.1 Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	34
2.1.3.2 Diarrhées infectieuses	35
2.2 Exploitation industrielles et technologiques des bactéries lactiques	36
2.2.1 Utilisation dans les produits laitiers fermentés	36
2.2.2 Propriétés fonctionnelles utiles à l'industrie	38
2.2.3 Sécurité microbiologique des souches	39
2.2.3.1 Sensibilité aux antibiotiques :	39
2.2.3.2 Activité hémolytique, DNase et gélatinase	39
2.2.3.3 Production d'amines biogènes	39
2.2.3.4 Risques liés à <i>Enterococcus faecium</i>	40
2.2.4 Propriétés de bio-conservation	40
2.2.5 Intérêt stratégique de la valorisation des souches locales	42
2.2.5.1 Réduction de la dépendance aux cultures importées	42
2.2.5.2 Valorisation du patrimoine laitier algérien	42
2.2.5.3 Développement de probiotiques locaux	43
3 MATÉRIEL ET METHODES	44
3.1 Matériel	45
3.1.1 Matériel biologique	45
3.1.1.1 Lait cru	45
3.1.1.2 Souches de références	45
3.1.2 Matériel non biologique	46
3.2 Méthodes	46
3.2.1 Isolement, purification et conservation des souches lactiques	46
3.2.1.1 Enrichissement	46
3.2.1.2 Isolement et conditions de culture	46
3.2.1.3 Etude des caractères morphologiques et biochimiques	47
3.2.1.4 Conservation des isolats présélectionnés	48
3.2.2 Criblage antibactérien des souches lactiques	50
3.2.2.1 Souches indicatrices	50
3.2.2.2 Préparation des inocula	50

3.2.2.2.1	Isolats lactiques	50
3.2.2.2.2	Souches indicatrices	50
3.2.2.3	Inoculation et conditions de culture	51
3.2.3	Identification protéomique des isolats criblés	53
3.2.3.1	Méthode analytique	53
3.2.4	Evaluation phénotypique de l'innocuité	54
3.2.4.1	Sensibilité des souches lactiques aux antibiotiques	54
3.2.4.2	Activité hémolytique	55
3.2.4.3	Test de DNase	56
3.2.4.4	Détection de l'activité gélatinase	56
3.2.4.5	Formation des amines biogènes	56
3.2.5	Évaluation des propriétés probiotiques des souches lactiques sélectionnées	57
3.2.5.1	Résistance des souches lactiques aux conditions gastro-intestinales	57
3.2.5.1.1	Préparation des inocula	57
3.2.5.1.2	Tolérance aux pH acides	57
3.2.5.1.3	Tolérance aux sels biliaires	58
3.2.5.2	Propriétés fonctionnelles de surface cellulaire	61
3.2.5.2.1	Auto-agrégation	61
3.2.5.2.2	Hydrophobicité	61
3.2.6	Identification génotypique des souches présentant le meilleur profile probiotique	62
3.2.6.1	Extraction de l'ADN génomique	62
3.2.6.2	Amplification du gène de l'ARNr 16S	62
3.2.6.3	Séparation par électrophorèse	63
3.2.6.4	Purification des amplicons	63
3.2.6.5	Séquençage des amplicons purifiés	63
3.2.6.6	Identification et enregistrement dans GenBank	64
3.2.6.7	Etablissement de l'arbre phylogénétique	65
3.2.7	Détection génotypique des gènes de virulence et de résistance	65
3.2.7.1	Extraction de l'ADN bactérien :	65
3.2.7.2	Réaction de PCR	65
3.2.7.2.1	Préparation du mélange réactionnel	66
3.2.7.2.2	Amplification des gènes cibles	66
3.2.7.3	Révélation par électrophorèse	68
3.2.8	Profil de fermentation des hydrates de carbone	68
3.2.8.1	Mode opératoire	68
3.2.8.1.1	Préparation des galeries	68
3.2.8.1.2	Préparation de l'inoculum	68
3.2.8.1.3	Inoculation des galeries	69
3.2.9	Etude statistique	69
4	RESULTATS ET DISCUSSION	70
4.1	Isolement et identification phénotypique des bactéries lactiques	70

4.2	Criblage antibactérien des souches lactiques	74
4.3	Identification protéomique des isolats lactiques sélectionnés	77
4.4	Aspect sécuritaire des souches lactiques sélectionnées	80
4.4.1	Sensibilité aux antibiotiques :	80
4.4.2	Activité hémolytique, DNase et Gélatinase	84
4.4.3	Production d'amines biogènes à partir de l'histidine, la tyrosine et la lysine	86
4.5	Aspect fonctionnel des souches lactiques sélectionnées	90
4.5.1	Tolérance aux conditions gastro-intestinales	90
4.5.1.1	Tolérance aux pH acides	90
4.5.1.1.1	Taux de survie à pH 3	90
4.5.1.1.2	Taux de survie à pH 2	92
4.5.1.1.3	Taux de survie à pH 1,5	93
4.5.1.2	Résistance aux sels biliaires	94
4.5.1.2.1	Taux de survie à 0,3 % de sels biliaires	94
4.5.1.2.2	Taux de Survie à 0,5 % de sels biliaires	95
4.5.1.2.3	Taux de survie à 1 % de sels biliaires	96
4.5.2	Propriétés de la paroi cellulaire	99
4.5.2.1	Capacité d'auto-agrégation	100
4.5.2.2	Hydrophobicité	101
4.6	Confirmation génotypique de l'appartenance des souches retenues	102
4.7	Résultats moléculaires de l'aspect sécuritaire	104
4.8	Profils de fermentation des hydrates de carbone sur la galerie API 50CH	107
	CONCLUSION	109
	APPENDICES	111
	Liste des symboles et des abréviations	111
	Composition des milieux de culture	113
	Méthode de la coloration de GRAM	117
	Principe de MALDI TOF	117
	Diamètres des zones d'inhibition	119
	Profils spectrales des souches sélectionnées	123
	Séquences du gène 16S rRNA des souches d'enterococcus faecium sélectionnées	125
	REFERENCES	133

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 : Schéma représentant les différentes voies de la fermentation des hexoses par des bactéries lactiques.	20
Figure 1.2 : Schéma de la fermentation des pentoses par les bactéries lactiques.	21
Figure 1.3 : Schéma de la composition du gène de l'ARNr 16S	27
Figure 2.1 : Critères de screening des bactéries probiotiques	31
Figure 2.2 : Évolution du microbiote intestinal au cours de la vie.	32
Figure 2.3 : Facteurs affectant l'équilibre du microbiote intestinal	33
Figure 2.4 : Mode d'action des bactériocines en tant qu'agents antimicrobiens.	42
Figure 3.1 : Schéma d'isolement, purification et conservation des souches lactiques.	49
Figure 3.2 : Schéma de l'activité antibactérienne par la méthode des spots.	52
Figure 3.3 : Résistance des souches lactiques aux conditions digestives simulées	60
Figure 4.1 : Morphologie d'isolat lactique sur gélose MRS/M17 (A, C, E) et observations microscopiques après coloration de Gram (B, D, F) des souches de <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus lactis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> isolées à partir de lait cru.	71
Figure 4.2 : Distribution des isolats lactiques selon leurs capacités à inhiber des souches indicatrices.	74
Figure 4.3 : Diamètres moyens des zones d'inhibition formées par les 12 isolats lactiques sélectionnés contre quatre souches pathogènes de référence.	76
Figure 4.4 : Dendrogramme généré par MALDI-TOF MS pour les souches d' <i>Enterococcus faecium</i> (blue) et <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> (rouge).	79
Figure 4.5 : Profils d'antibiogramme des souches de <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> LMMDR22 et <i>Enterococcus faecium</i> LMBMR28.	80
Figure 4.6 : Activité hémolytique des souches <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> LMMDR22, <i>Enterococcus faecium</i> LVBBR25 et du témoin positif <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose au sang.	84
Figure 4.7 : Test de la gélatinase pour certaines souches de <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> .	85
Figure 4.8 : Test de DNase pour certaines souches de <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> .	85
Figure 4.9 : Test de Décarboxylase (HDC, TDC et LDC) pour certaines souches de <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> .	88

Figure 4.10 : Taux de survie (%) des souches de <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> à un pH 3 après 1 à 3 h d'incubation	91
Figure 4.11 : Taux de survie (%) des souches d' <i>Enterococcus faecium</i> à un pH 3 après 1 à 3 h d'incubation.	91
Figure 4.12 : Taux de survie (%) des souches de <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> à un pH 2 après 1 à 3 h d'incubation	92
Figure 4.13 : Taux de survie (%) des souches d' <i>Enterococcus faecium</i> à un pH 2 après 1 à 3 h d'incubation	93
Figure 4.14 : Taux de survie (%) des souches d' <i>Enterococcus faecium</i> à un pH 1,5 après 1 à 3 h d'incubation	93
Figure 4.15 : Taux de survie (%) des souches de <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> à une concentration de 0,3 % en sels biliaires après 24 h d'incubation	94
Figure 4.16 : Taux de survie (%) des souches d' <i>Enterococcus faecium</i> à une concentration de 0,3 % en sels biliaires après 24 h d'incubation	95
Figure 4.17 : Taux de survie (%) des souches de <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> à une concentration de 0,5 % en sels biliaires après 24 h d'incubation	95
Figure 4.18 : Taux de survie (%) des souches de d' <i>Enterococcus faecium</i> à une concentration de 0,5 % en sels biliaires après 24 h d'incubation	96
Figure 4.19 : Taux de survie (%) des souches de <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> à une concentration de 1 % en sels biliaires après 24 h d'incubation.	97
Figure 4.20 : Taux de survie (%) des souches d' <i>Enterococcus faecium</i> à une concentration de 1 % en sels biliaires.	97
Figure 4.21 : Taux d'auto-agrégation des souches d' <i>Enterococcus faecium</i> après 3 h et 24 h	100
Figure 4.22 : Taux d'hydrophobicité des souches d' <i>Enterococcus faecium</i> mesuré par adhésion au xylène	101
Figure 4.23 : Électrophorèse des produits de PCR du gène 16S rRNA chez les souches d' <i>Enterococcus faecium</i>	103
Figure 4.24 : Arbre phylogénétique basé sur la séquence 16S rRNA des souches d' <i>Enterococcus faecium</i> sélectionnées, avec <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> utilisé comme groupe externe.	104
Figure 4.25 : Électrophorèse des produits de PCR pour les gènes cylA, hyl et ace chez les souches d' <i>Enterococcus faecium</i> sélectionnées.	105
Figure 4.26 : Électrophorèse des produits de PCR pour les gènes esp, gelE et efaAfm chez les souches d' <i>Enterococcus faecium</i> sélectionnées.	105
Figure 4.27 : Électrophorèse des produits de PCR pour les gènes Van A et Van B chez les souches d' <i>Enterococcus faecium</i> sélectionnées.	106

Tableau 1.1 : Sources des bactéries lactiques	19
Tableau 1.2 : Bactériocines produites par des bactéries lactiques [40, 41]	25
Tableau 3.1 : Répartition des échantillons de lait cru selon les animaux et les régions.	45
Tableau 3.2 : Milieux et conditions de culture des souches lactiques.	47
Tableau 3.3 : Interprétation des scores MALDI-TOF MS.	53
Tableau 3.4 : Antibiotiques testés à l'égard des souches lactiques sélectionnées	55
Tableau 3.5 : Composition du mix réactionnel pour l'amplification du gène de l'ARNr 16S	63
Tableau 3.6 : Composition du mix réactionnel pour le séquençage du gène de l'ARNr 16S	64
Tableau 3.7 : Composition du mélange réactionnel pour la détection des gènes ciblés	66
Tableau 3.8 : Amorces utilisées pour la détection des gènes de virulences et de résistance à la vancomycine.	67
Tableau 4.1 : Répartition et caractéristiques phénotypiques des isolats microbiens issus de laits crus d'animaux d'élevage.	73
Tableau 4.2 : Diamètres des zones d'inhibition des 12 isolats lactiques retenus.	76
Tableau 4.3 : Identification protéomique des isolats sélectionnés.	78
Tableau 4.4 : Profil de sensibilité des souches de <i>Lactococcus lactis</i> aux antibiotiques testés.	81
Tableau 4.5 : Profil de sensibilité des souches d' <i>Enterococcus faecium</i> aux antibiotiques testés.	83
Tableau 4.6 : Profil enzymatique (hémolyse, DNase, gélatinase) des souches sélectionnées de <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> .	86
Tableau 4.7 : Profil des souches lactiques pour la décarboxylation de la tyrosine, de la lysine et de l'histidine.	87
Tableau 4.8 : Résultats du séquençage 16S rRNA des souches retenues	103
Tableau 4.9 : Résultats de la fermentation de différents sucres par les souches d' <i>Enterococcus faecium</i> après 48 h d'incubation.	108

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les bactéries lactiques (BL) sont des micro-organismes largement répandus dans divers environnements, tels que les produits laitiers, les végétaux fermentés et le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux. Elles jouent un rôle essentiel dans l'industrie agroalimentaire, notamment dans la fermentation de produits comme les fromages, les yaourts ou les laits fermentés [1, 2]. En plus de leur intérêt technologique, les LAB attirent une attention croissante pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine, notamment en tant que probiotiques [3].

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, procurent un bénéfice pour la santé de l'hôte [4]. Pour qu'une souche soit considérée comme probiotique, elle doit répondre à plusieurs critères : survivre au transit gastro-intestinal, présenter un profil sécuritaire (absence de gènes de virulence ou de résistance acquise aux antibiotiques), pouvoir adhérer aux cellules intestinales, et produire des substances antimicrobiennes capables d'inhiber les pathogènes [5, 6].

Dans de nombreux pays, y compris en Algérie, l'usage industriel de ferments lactiques repose essentiellement sur des souches importées [7, 8]. Celles-ci ne sont pas toujours adaptées aux conditions locales ni aux substrats disponibles, ce qui limite l'optimisation des procédés fermentaires locaux et freine le développement de produits valorisant les ressources endogènes. En parallèle, les recherches portant sur les LAB autochtones issues de lait cru restent limitées, en particulier concernant leur profil de sécurité et leur potentiel en tant que probiotiques [9, 10].

Ce manque de données soulève une problématique centrale : existe-t-il, parmi les souches lactiques locales, des candidats probiotiques sûrs, actifs contre des pathogènes alimentaires et capables de survivre au transit digestif humain ?

L'identification de telles souches permettrait non seulement de réduire la dépendance aux souches importées et développer des solutions adaptées aux besoins locaux, mais aussi de répondre à une demande croissante en solutions probiotiques naturelles et adaptées aux habitudes alimentaires locales [11].

La diversité microbienne intestinale, qui peut atteindre jusqu'à 10^{12} microorganismes par gramme de contenu luminal, est étroitement liée à la santé de l'hôte. Elle influence la digestion, la fonction immunitaire et la protection contre diverses maladies [12, 13]. Une dysbiose intestinale peut résulter de nombreux facteurs tels que les antibiothérapies, une alimentation déséquilibrée, ou certaines pathologies chroniques [14, 15]. Pour préserver cet équilibre, l'apport régulier de probiotiques résistants aux conditions gastriques et biliaires est nécessaire [5].

Dans cette optique, l'objectif de cette étude est de contribuer à la caractérisation de souches de bactéries lactiques autochtones, en mettant l'accent sur leur activité antimicrobienne, leur sécurité et leur fonctionnalité probiotique. L'étude comprend les étapes suivantes :

- Isolement et purification de souches de bactéries lactiques à partir de lait cru issu de différentes espèces animales élevées en Algérie ;
- Sélection des souches présentant une activité antibactérienne marquée vis-à-vis de quatre pathogènes alimentaires majeurs ;
- Identification des souches retenues par spectrométrie de masse MALDI-TOF MS et séquençage du gène 16S ;
- Évaluation de leur sécurité à travers des tests phénotypiques (antibiogramme, activité hémolytique, DNase, gélatinase, production d'amines biogènes) et génotypiques (présence de gènes de virulence ou de résistance) ;
- Analyse de leur tolérance à des conditions simulant le tractus gastro-intestinal (acidité gastrique, sels biliaires), et étude de leurs propriétés d'adhésion (auto-agrégation, hydrophobicité) ;
- Détermination de leurs profils fermentaires à partir de différents substrats glucidiques.

Ce travail s'inscrit dans une démarche de valorisation des ressources microbiologiques locales, en vue d'applications agroalimentaires et éventuellement thérapeutiques. Il vise également à poser les bases pour la création d'une banque de souches autochtones à potentiel probiotique, utile tant pour la recherche que pour l'industrie.

PARTIE 1

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

1 GÉNÉRALITÉ SUR LES BACTÉRIES LACTIQUES

1.1 Historique et découverte

Selon Tailliez [16], en se basant sur les données de paléontologie et de biologie moléculaire, ainsi que sur certaines caractéristiques du métabolisme carboné, l'apparition des bactéries lactiques dans l'univers remonte à environ 3 milliards d'années. La fermentation est l'un des processus les plus anciens de transformation et de bio-conservation des denrées alimentaires. Elle est provoquée par les micro-organismes naturellement présents dans la matière première (produit lui-même ou son contenant). Ce phénomène a été historiquement observé de manière empirique [17]. Les premières observations des micro-organismes ont été réalisées par Hooke et Leeuwenhoek entre 1665 et 1683 [18]. Les travaux de Lister en 1873 ont permis d'isoler la souche de *Lactococcus lactis*, ce qui a contribué à l'avancement des connaissances sur les bactéries lactiques. L'expression « bactéries lactiques » a été introduite pour la première fois en 1919 dans la monographie d'Orla-Jensen, et la notion de ces bactéries en tant que catégorie d'organismes n'a émergé que dans les années 1990 [19].

Au fil du temps, des avancées notables ont été accomplies dans ce domaine, et ces dernières décennies, le développement technologique dans le secteur de la microbiologie alimentaire a connu une croissance significative concernant la sélection des souches à effets technologiques, responsables de la fermentation (starters) et de diverses autres fonctions telles que la saveur, les arômes et la texture [20]. Cette question concerne également les probiotiques employés dans la fabrication des aliments fonctionnels [21].

1.2 Taxonomie

Les bactéries lactiques forment un groupe varié de micro-organismes essentiels à la fermentation alimentaire et à la santé humaine. Ces bactéries gram-positives, aéro-anaérobies facultatives, non sporulées, négatives pour la catalase et l'oxydase, se distinguent par leur aptitude à générer de l'acide lactique comme produit final [22]. Phylogénétiquement, les bactéries lactiques appartiennent au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales*. Les familles présentant les genres les plus fréquemment observés sont les *Lactobacillaceae* (genres : *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*) ; les *Enterococcaceae* (genre : *Enterococcus*) ; les *Leuconostocaceae* (genres

: *Leuconostoc* et *Weissella*) et les *Streptococcaceae* (genres : *Streptococcus* et *Lactococcus*). [1, 23]. D'après Sionek et al [17]. Les LAB se réunissent en 26 genres et 261 espèces.

Selon la classification de Bergey (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) [1]. Les caractéristiques possédées par les genres les plus employés sont présentées ci-après.

1.2.1 *Lactobacillus*

Les lactobacilles présentent une forme microscopique le plus souvent en bâtonnet (Bacille) long ou court, et parfois en coccobacille. Elles se regroupent fréquemment en chaîne. La croissance dépendra des milieux complexes en nutriments, d'une température comprise entre 2 et 53°C, avec un optimal situé entre 30 et 40°C et d'un pH compris entre 5.5 et 6.2. Les espèces de ce genre se différencient, phénotypiquement, en première lieu selon le type fermentaire, après selon la capacité à fermenter les hydrates de carbone [24].

1.2.2 *Paralactobacillus*

Les espèces de ce type ont une forme microscopique bacillaire et se regroupant en chaîne. Elles croissent à un pH identique à celui des lactobacilles et elles se développent lentement à une température de 15°C et ne pas à 45°C. Leur type fermentaire est homolactique [25]

1.2.3 *Pediococcus*

Ce genre comprend neuf espèces ainsi que deux sous-espèces appartenant à *Pediococcus pentosaceus*. Les cellules de ce genre se présentent sous une forme cocci au niveau microscopique, parfois en coccobacilles. Elles s'organisent en diplocoques ou en tétrades et sont homofermentaires. La croissance optimale se situe dans une plage de température comprise entre 25 et 35 °C, avec un pH optimal autour de 5 [26].

1.2.4 *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* était auparavant inclus dans celui des *Streptococcus*. Les cellules d'*Enterococcus* sont ovoïdes et se présentent généralement en paires, mais peuvent également apparaître isolées ou en courtes chaînes. Certaines souches manifestent une activité pseudo-catalytique lorsqu'elles sont cultivées sur gélose au sang. Leur activité hémolytique est variable, certaines souches n'étant pas considérées comme sûres. Ces bactéries se développent dans une plage de température allant de 10 à 45 °C, avec une température optimale comprise entre 35 et 37 °C pour la majorité des espèces. Elles nécessitent un milieu de culture riche en nutriments et possèdent un métabolisme

homofermentaire. Les espèces d'*Enterococcus* sont réparties en six groupes principaux : *Enterococcus faecium* (7 espèces), *Enterococcus avium* (6 espèces), *Enterococcus faecalis* (6 espèces), *Enterococcus gallinarum* (2 espèces), *Enterococcus italicus* (2 espèces) et *Enterococcus cecorum* (2 espèces). La distinction phénotypique des espèces est délicate, rendant les approches moléculaires, telles que le séquençage du gène de l'ARNr 16S, la méthode la plus fiable pour leur identification [27].

1.2.5 Leuconostoc

Le genre *Leuconostoc* comprend dix espèces et trois sous-espèces appartenant à *Leuconostoc mesenteroides*. Microscopiquement, ces bactéries se présentent sous forme de cocci parfois légèrement allongés, donnant un aspect ovale (coccobacilles), et s'organisent en paires (diplocoques) ou en courtes chaînes. Ces espèces se développent préférentiellement à un pH de 6,5 et dans une plage de température comprise entre 20 et 30 °C. La culture de ce genre est exigeante, les colonies apparaissant seulement après 3 à 5 jours d'incubation sous forme de colonies très fines. Les espèces de *Leuconostoc* produisent du dioxyde de carbone (CO₂) et présentent des profils de fermentation des glucides variables selon les espèces [28]

1.2.6 Weissella

Les souches du genre *Weissella* apparaissent au microscope sous la forme de petits bacilles aux extrémités arrondies ou ovoïdes. Les cellules se regroupent en paires ou en courtes chaînes. Elles nécessitent des milieux de culture complexes et possèdent un métabolisme hétérofermentaire du glucose. Leur croissance optimale se situe à un pH compris entre 6 et 7 et dans une plage de température allant de 15 à 42 °C. Il est important de noter que la distinction phénotypique entre les espèces de *Weissella*, celles de *Leuconostoc* et les *Lactobacillus* hétérofermentaires est difficile [29].

1.2.7 Streptococcus

Les cellules du genre *Streptococcus* sont généralement coccoïdes, parfois ovoïdes, et s'organisent principalement en chaînes, rarement en paires. Leur métabolisme de glucose est homofermentaire. La majorité des espèces se développent à une température proche de 37 °C et à un pH neutre [30]. Parmi ces espèces, *Streptococcus thermophilus* est particulièrement utilisée à des fins technologiques, notamment dans la fabrication du yaourt [31]. En revanche, la plupart des autres espèces sont impliquées dans des infections nosocomiales [32]. Les *Streptococcus thermophiles* ne se développent pas à 15 °C, à un pH

de 9,6 ni en présence de 0,1 % de bleu de méthylène. Leur multiplication optimale se situe à 45 °C, avec une tolérance à 65 °C pendant 30 minutes.

1.2.8 *Lactococcus*

Le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces et trois sous-espèces appartenant à *Lactococcus lactis*. Ces bactéries se présentent sous forme de cocci, seuls, en paires ou en courtes chaînes, et possèdent un métabolisme homofermentaire. Elles se développent dans une plage de température comprise entre 10 et 40 °C, tolèrent une concentration en NaCl jusqu'à 4 % et croissent dans du lait additionné de 0,1 % de bleu de méthylène. Elles sont incapables de se multiplier à 45 °C ni en présence de 6,5 % de NaCl. Les espèces de *Lactococcus* présentent des profils fermentaires différents, ce qui permet de les distinguer notamment par la fermentation des hydrates de carbone [33].

1.3 Habitats

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes ubiquistes [16]. Elles colonisent divers habitats où les hydrates de carbone sont disponibles, notamment les aliments destinés à la consommation humaine ou animale tels que les produits laitiers, céréaliers, carnés et piscicoles, ainsi que la bière, le vin, les fruits et jus de fruits, les légumes marinés, la purée, la choucroute, l'ensilage et le levain. Elles sont également présentes dans l'eau, le sol, les eaux usées, ainsi que sur les muqueuses de la cavité buccale et au niveau des voies respiratoires, gastro-intestinales et génitales de l'homme et des animaux [19]. Chaque niche écologique se caractérise cependant par la présence d'espèces spécifiques. Cette diversité peut être influencée par les pratiques appliquées aux produits [34].

D'après les données bibliographiques, comparativement aux différentes matrices hébergeant des bactéries lactiques, le lait constitue un milieu particulièrement favorable à la majorité des genres. Toutefois, la composition nutritionnelle du lait, qui varie selon l'espèce animale, ainsi que les conditions d'hygiène variables chez les éleveurs, ainsi que les modalités de transport et de stockage du lait, influencent significativement la dominance de certaines espèces.

Tableau 1.1 : Sources des bactéries lactiques

Genre lactique	Matrice	Références
<i>Lactococcus</i>	Lait et produits laitiers.	[33, 35]
<i>Lactobacillus</i>	Lait et produits laitiers, Végétaux et leurs produits fermentés, Poisson et poisson mariné, Viande et dérivés, Cavité orale et tractus intestinal de l'homme et des animaux, Céréales. Boissons fermentées, Levain, Eaux usées, Fumier et Ensilage.	[19, 24, 35]
<i>Leuconostoc</i>	Lait, Végétaux, Produits à base de viandes et Vin	[19, 28, 35]
<i>Pediococcus</i>	Lait, Produits laitiers, Viande, Végétaux et produits fermentés, Céréales et Bière.	[19, 26, 35]
<i>Enterococcus</i>	Lait cru, Tractus intestinal et la matière fécale de l'homme et des animaux, Eaux usées, Matériel clinique et Environnement.	[19, 27]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Lait et produits laitiers.	[30, 35]

1.4 Types fermentaires

Selon les métabolites produits lors de la dégradation des glucides par les souches lactiques, trois types de bactéries peuvent être distingués [24, 36].

1.4.1 Bactéries homofermentaires obligatoires

Ces bactéries produisent exclusivement de l'acide lactique à partir de la fermentation des hexoses via la voie d'Embden-Meyerhof (glycolyse) [24]. Elles possèdent la fructose-1,6-bisphosphate-aldolase mais ne possèdent pas la phosphokétolase, ce qui implique qu'elles ne fermentent ni le gluconate ni les pentoses, comme illustré dans la figure 1.1. [37].

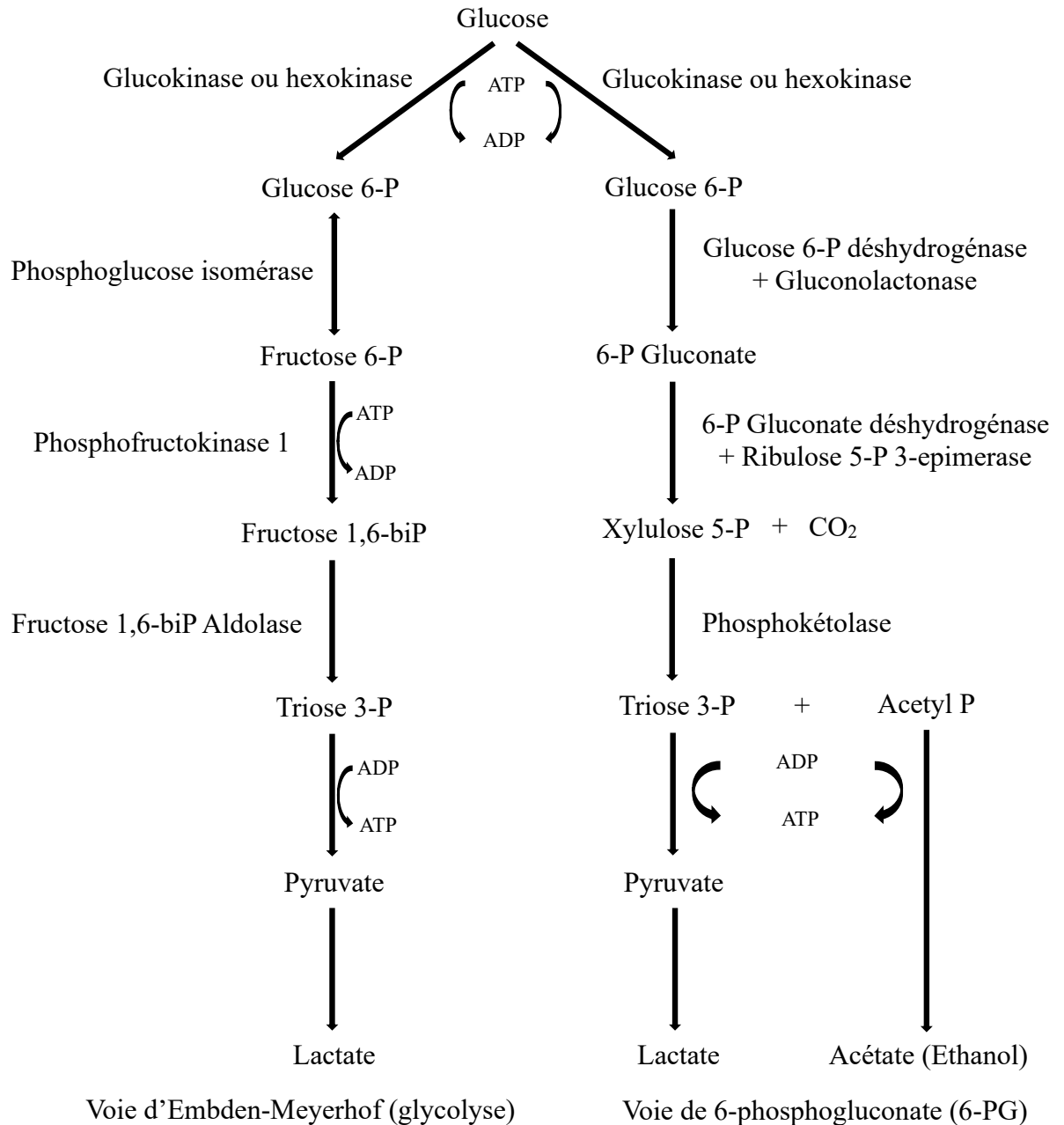


Figure 1.1 : Schéma représentant les différentes voies de la fermentation des hexoses par des bactéries lactiques [36].

1.4.2 Bactéries homo-hétérofermentaires facultatives

Ces bactéries fermentent le glucose principalement par la voie d'Embden-Meyerhof, produisant majoritairement de l'acide lactique. En cas de limitation en glucose, elles peuvent utiliser d'autres hexoses et produire, en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'éthanol et de l'acide formique (figure 1.2). Ces micro-organismes possèdent à la fois des aldolases et la phosphokétolase, ce qui leur permet de fermenter les pentoses en formant de

1.5 Métabolites générés par les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques catabolisent divers macronutriments, tels que les polysaccharides indigestes (prébiotiques) et les protéines complexes, ainsi que des micronutriments comme les glucides simples, les acides aminés et les acides gras, afin de produire de l'énergie, soutenir certaines activités biologiques et générer des métabolites qui contribuent directement ou indirectement aux processus de transformation des denrées alimentaires et à la régulation de réactions biochimiques dans l'organisme [39].

1.5.1 Acides organiques

Les principaux acides organiques produits par les bactéries lactiques comprennent l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide 3-hydroxypropionique, l'acide formique et l'acide succinique. L'acide lactique est majoritairement produit lors de fermentations homofermentaires, tandis que l'acide acétique est prédominant dans les fermentations hétérofermentaires. Certaines espèces métabolisant le glycérol peuvent synthétiser de l'acide 3-hydroxypropionique via une voie spécifique. L'acide succinique est généralement produit en conditions anaérobies. Ces acides se forment aussi bien dans les matrices alimentaires que dans l'intestin, où ils peuvent être produits par des probiotiques [39].

1.5.2 Peroxyde d'Hydrogène (H_2O_2)

La majorité des bactéries lactiques produisent du peroxyde d'hydrogène en présence d'oxygène. Ce composé possède une activité antibactérienne même à faible concentration, ciblant notamment les bactéries pathogènes, les micro-organismes altérants et certains champignons [40].

1.5.3 Dioxyde de carbone (CO_2)

Le dioxyde de carbone est principalement généré par les bactéries hétérofermentaires obligatoires via la voie du 6-phosphogluconate. Ce gaz joue un double rôle : il favorise la création d'une atmosphère anaérobie et exerce un effet antibactérien contre les micro-organismes aérobies stricts responsables de la détérioration de nombreuses matrices, en particulier végétales [40].

1.5.4 Vitamines

La production de vitamines par les bactéries lactiques a été largement démontrée, principalement pour les vitamines hydrosolubles du groupe B et la vitamine C. Parmi les vitamines fréquemment synthétisées figurent l'acide folique (B9), essentiel à la biosynthèse des protéines et des nucléotides ; la pyridoxine (B6) ; la riboflavine (B2) ; la cobalamine (B12) ; ainsi que l'acide ascorbique (vitamine C). La vitamine K2 peut également être produite, notamment par *Lactococcus lactis subsp. cremoris* MG1363 lors de la fermentation du fructose ou du tréhalose [39].

1.5.5 Exopolysaccharides

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères de monosaccharides produits par polymérisation. Ils présentent des fonctions probiotiques et technologiques, et sont largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire et cosmétique comme agents de gélification, de stabilisation et d'émulsification [39].

1.5.6 Acide Gamma-Aminobutyrique (GABA)

Certaines souches dotées de l'enzyme glutamate décarboxylase peuvent produire de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) à partir du glutamate. Le GABA est un neurotransmetteur majeur du système nerveux central, dont la concentration cérébrale est liée à diverses pathologies neurologiques [39].

1.5.7 Substances aromatiques

Au cours de la transformation des denrées alimentaires, les bactéries lactiques peuvent convertir certains composés en substances aromatiques telles que des acides organiques, alcools, cétones et esters. Ces substances se forment généralement par biosynthèse, action enzymatique, décomposition oxydative ou pyrolyse. Deux voies principales sont reconnues : la voie métabolique de l'acide citrique, générant du diacétyl et de l'acétoïne, et la décomposition des acides aminés, conduisant à la formation d'acétaldéhyde [39].

1.5.8 Composés antioxydants

Les radicaux libres sont impliqués dans de nombreuses maladies, notamment le cancer. Les antioxydants jouent un rôle crucial en les neutralisant. Ils sont également importants pour la conservation des aliments, notamment pour prévenir le brunissement. Les bactéries lactiques sont capables de produire divers composés antioxydants, incluant des vitamines, des

polysaccharides, des métabolites phénoliques actifs et des glucosides d'acide chlorogénique [39].

1.5.9 Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés ribosomialement, caractérisés par une forte activité antibactérienne. Elles ciblent une large gamme de micro-organismes, incluant bactéries altérantes, pathogènes, levures et virus. Leur mode d'action consiste à augmenter la perméabilité membranaire, inhiber la synthèse de la paroi cellulaire, la production d'acides nucléiques ou la synthèse protéique, agissant ainsi comme des agents bactéricides ou bactériostatiques similaires aux antibiotiques [39].

1.5.9.1 Classification des bactériocines

Selon Zacharof et Lovitt [41], les bactériocines sont classées en fonction de leur poids moléculaire et de la composition de leurs chaînes peptidiques. La majorité des bactériocines produites par les bactéries lactiques ont une masse inférieure à 10 kDa, sont cationiques, thermostables et amphiphiles. Elles se divisent en trois classes principales :

1.5.9.1.1 Lantibiotiques

Cette classe regroupe des peptides de masse moléculaire inférieure à 5 kDa, caractérisés par la présence d'acides aminés thioéthers polycycliques (lanthionine ou méthyllanthionine). Ils se subdivisent en deux types :

- Type A : peptides allongés (2–4 kDa) formant des structures hélicoïdales, agissant principalement par formation de pores dans les membranes cytoplasmiques. Exemples : Nisine, Lacticine 3147.
- Type B : peptides globulaires (2–3 kDa) avec des modes d'action variés.

1.5.9.1.2 Non Lantibiotiques

Composés de peptides de moins de 10 kDa, ces bactériocines ne contiennent pas de lanthionine. Elles se répartissent en deux sous-classes :

- Sous-classe II-a (pediocines) : actives principalement contre *Listeria*, caractérisées par une séquence N-terminale Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys. Exemples : Pediocin PA-1, Saccaine A.
- Sous-classe II-b : composées de deux peptides distincts agissant en synergie, comme Lactacine F et Lactococcine G.

1.5.9.1.3 Bactériolysines

Peu fréquentes, ces bactériocines ont un poids moléculaire supérieur à 30 kDa et sont thermolabiles. Leur activité bactéricide peut être détruite par la chaleur, ce qui nécessite un contrôle rigoureux de la température lors de leur concentration. Elles sont principalement produites par des espèces des genres *Lactobacillus* et *Enterococcus*.

Tableau 1.2 : Bactériocines produites par des bactéries lactiques [40, 41]

Bactériocine	Espèce productrice
Lactacin F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Lactocin 705	<i>Lactobacillus casei</i>
Lactocin G	<i>Lactobacillus lactis</i>
Helveticin	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Plantaricin (EF, W, JK, S)	<i>L. plantarum spp</i>
Lactococcin MN	<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>
Nisin	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
Leucocin H	<i>Leuconostoc spp</i>
Pediocin A	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Pediocin AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Enterocin	<i>Enterococcus faecium</i>

1.6 Mise en évidence des bactéries lactiques

L'isolement et l'identification des bactéries lactiques reposent sur diverses méthodes, dont le choix dépend essentiellement des objectifs de l'étude et des équipements disponibles. Pour évaluer la diversité microbienne présente dans une matrice, les avancées récentes en microbiologie moléculaire, notamment la métagénomique, ont considérablement amélioré la sophistication et la fiabilité des analyses [42]. Toutefois, dans le cadre de la valorisation d'une souche spécifique, le recours aux méthodes classiques reste indispensable. En laboratoire, la mise en évidence des bactéries lactiques s'effectue généralement par des approches phénotypiques, génotypiques ou combinées.

1.6.1 Méthodes phénotypiques

Traditionnellement, les bactéries lactiques sont classées selon leurs caractéristiques phénotypiques, incluant les traits morphologiques, physiologiques et biochimiques. Ces

méthodes sont particulièrement utilisées dans les analyses de routine des laboratoires de microbiologie industrielle et appliquée [43]. En recherche, elles permettent une présomption d'espèces mais ne garantissent pas une identification précise, car des espèces appartenant à un même genre peuvent partager des caractéristiques similaires [44, 45]. Par ailleurs, les tests visant à détecter des micro-organismes à intérêt probiotique ou technologique doivent être confirmés phénotypiquement, car la simple présence d'un gène dans l'ADN ne garantit pas son expression, qui peut être réprimée [46]. Ces méthodes restent efficaces pour le criblage initial des bactéries en fonction des objectifs spécifiques.

1.6.2 Méthodes moléculaires

Les approches moléculaires permettent soit la détection de molécules produites (protéomique), soit l'analyse des séquences génétiques.

1.6.2.1 Approche protéomique (MALDI-TOF)

L'identification par spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser assistée par matrice couplée à un analyseur de temps de vol (MALDI-TOF MS) est devenue une méthode courante pour le diagnostic et l'identification microbienne. Cette technique se distingue par sa rapidité et sa faible exigence en main-d'œuvre. Outre l'identification des microorganismes, elle permet également de détecter des métabolites produits. Cependant, son efficacité dépend de la disponibilité des profils spectraux dans la base de données, limitant l'identification des espèces nouvelles [47]. Le principe consiste à mélanger l'échantillon avec une matrice absorbant l'énergie, qui, une fois cristallisée, permet l'ionisation par laser. Les ions générés sont ensuite séparés et détectés selon leur rapport masse/charge (m/z) [48].

1.6.2.2 Approche génotypique

Cette méthode repose sur l'analyse du matériel génétique, en particulier du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S), qui constitue une empreinte génétique fiable chez les bactéries [49]. Ce gène comprend environ 1500 paires de bases, réparties en 19 régions dont 10 sont conservées et 9 variables (voir figure 1.3), permettant ainsi une identification précise des espèces [50].

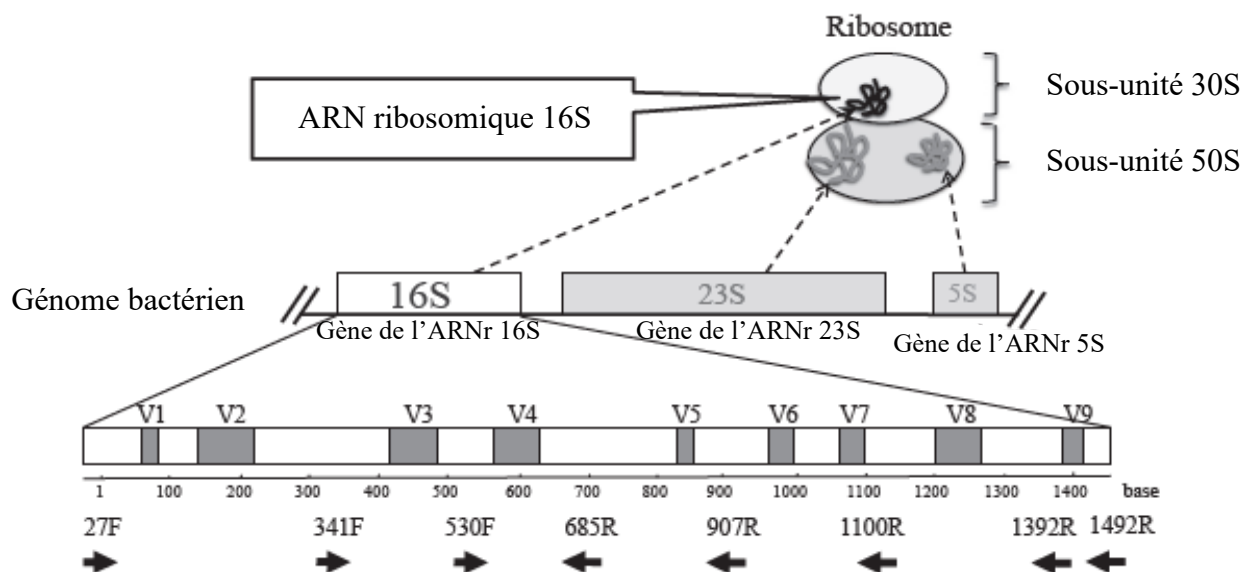


Figure 1.3 : Schéma de la composition du gène de l'ARNr 16S [50]. V1 à V9 : Régions variables (V pour variable) de l'ARNr 16S ; 27F, 341F, 530F, 685R, 907R, 1100R, 1392R, 1492R : Amorces utilisées pour l'amplification de différentes régions du gène 16S rRNA (F = forward, R = reverse).

Pour procéder à l'identification, il est d'abord nécessaire d'obtenir une séquence d'ADN pure. Cette dernière est extraite soit à l'aide de kits commerciaux, soit par choc thermique. L'étape suivante consiste à amplifier le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) par réaction en chaîne par polymérase (PCR), en utilisant les réactifs adéquats et des amorces. Deux types d'amorces sont couramment employés pour le gène ARNr 16S : des amorces universelles, utilisables pour la plupart des bactéries (notamment 27F et 1492R), et des amorces spécifiques ciblant des régions variables bien définies [51]. La réussite de l'amplification est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments amplifiés (amplicons) sont ensuite purifiés en vue de l'étape de séquençage [52].

Bien que des techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS) permettent aujourd'hui de séquencer un génome entier en un temps réduit, leur usage reste limité en raison de leur coût et de leur accessibilité. La méthode de Sanger demeure ainsi la technique la plus répandue dans les laboratoires de microbiologie moléculaire. Dans le cas d'amorces spécifiques, l'identification peut être réalisée par simple analyse électrophorétique, tandis que pour les amorces universelles, le séquençage des amplicons est indispensable afin de déterminer l'ordre des nucléotides et d'identifier précisément la souche bactérienne [53].

1.7 Maintenance des bactéries lactiques

Pour assurer la viabilité des bactéries lactiques, comme pour tout autre microorganisme, il est essentiel de leur fournir un support nutritif adéquat. Dans les denrées alimentaires, la teneur en matière organique doit rester suffisante tout au long de la période de stockage afin de préserver leur survie. Le froid, en ralentissant la croissance bactérienne, réduit également leur consommation de nutriments. Cependant, certains produits, tels que le levain, nécessitent un rafraîchissement régulier pour maintenir la population bactérienne active [54, 55].

Au cours de la digestion, la dégradation des macronutriments est assurée par des enzymes spécifiques localisées dans différentes parties du tube digestif. Les fibres alimentaires, considérées comme des prébiotiques, sont des glucides indigestes dont la dégradation requiert la présence de bactéries probiotiques dans l'intestin grêle et le côlon. Ces prébiotiques contribuent à l'équilibre de la microflore intestinale et favorisent l'activité des bactéries lactiques, notamment par la sécrétion de leurs postbiotiques [56].

1.8 Innocuité des bactéries lactiques

La colonisation du tractus intestinal des mammifères par des microorganismes probiotiques a été largement démontrée [57]. En général, les bactéries lactiques bénéficient du statut GRAS (Generally Recognized As Safe) et ne provoquent pas d'effets secondaires immunologiques résistances bactériennes transmissibles entre micro-organismes lors de la compétition [58]. Cependant, une évaluation rigoureuse de leur sécurité est indispensable, notamment en raison de l'usage excessif et non contrôlé des antibiotiques, particulièrement en agriculture, qui a favorisé le développement de résistances bactériennes transmissibles entre micro-organismes lors de la compétition [59].

Outre la résistance aux antibiotiques, les bactéries lactiques destinées à un usage probiotiques doivent être exemptes de gènes de virulence et ne présenter aucune activité hémolytique susceptible d'endommager les érythrocytes, ni de gélatinase pouvant altérer les membranes cellulaires, ni de DNase capable de dénaturer le matériel génétique (ADN) [60].

CHAPITRE 2

2 POTENTIEL FONCTIONNEL ET TECHNOLOGIQUE DES BACTERIES LACTIQUES.

2.1 Rôle des bactéries lactiques dans la santé humaine

2.1.1 Définition et critères des probiotiques

La définition des probiotiques selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) stipule qu'il s'agit de micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un effet bénéfique à l'hôte [4]. Historiquement, les produits fermentés étaient utilisés pour soulager certains troubles digestifs bien avant la compréhension des mécanismes liés aux probiotiques [57]. Les avancées en microbiologie ont permis d'identifier les bactéries lactiques comme agents responsables de cette activité probiotique. Pour exercer leur rôle efficacement, ces bactéries doivent atteindre leur site d'action « généralement l'intestin » en restant viables, ce qui nécessite une résistance aux conditions extrêmes du tube digestif et la capacité à produire des métabolites favorables au bien-être de l'hôte (figure 2.1) [5, 61].

Selon les données de littératures [60-66], les critères de sélection des souches probiotiques incluent :

- Tolérance au stress digestif
 - Résistance à l'acidité gastrique : l'estomac présente un pH inférieur à 3,6 selon l'état de jeûne. Les souches probiotiques doivent donc résister à un $\text{pH} \leq 3$ lors des tests de criblage.
 - Résistance aux sels biliaires : la digestion des lipides s'effectue principalement dans le duodénum, où la concentration en sels biliaires varie en fonction de la quantité de lipides ingérés. Les souches doivent résister à une concentration $\geq 0,3$ % de sels biliaires pour être considérées comme probiotiques.
- Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales
 - Auto-agrégation : la capacité des souches à s'agréger entre elles et à former des agrégats favorise leur persistance dans l'intestin.

- Hydrophobicité : lors du transit du chyme dans l'intestin grêle, la forte hydrophobicité des souches facilite leur contact et adhésion aux parois intestinales (entérocytes et colonocytes).
- Adhésion cellulaire : la capacité d'adhésion aux cellules intestinales assure la colonisation et la stabilité des probiotiques dans le tractus digestif.
- Activité antimicrobienne
 - Production de métabolites : les probiotiques synthétisent des acides organiques et des bactériocines ayant une activité inhibitrice contre les pathogènes.
 - Compétition : ils rivalisent avec les microorganismes indésirables pour les sites d'adhésion et les nutriments, limitant ainsi leur colonisation.
 - Co-agrégation : cette propriété empêche la prolifération et la formation de biofilms par les pathogènes.
- Innocuité

Les bactéries probiotiques doivent être exemptes de toute pathogénicité [61]. Ne pas porter de gènes de virulence ni de résistance aux antibiotiques. Les gènes de virulence codent pour des enzymes toxiques (hémolysines, DNase, gélatinase) pouvant endommager les cellules de l'hôte. Les gènes de résistance peuvent être transférés aux bactéries pathogènes, compliquant leur contrôle.

Selon Klein et al [67], les genres *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Bifidobacterium* sont les plus fréquemment utilisés en applications probiotiques pour la santé humaine et animale.

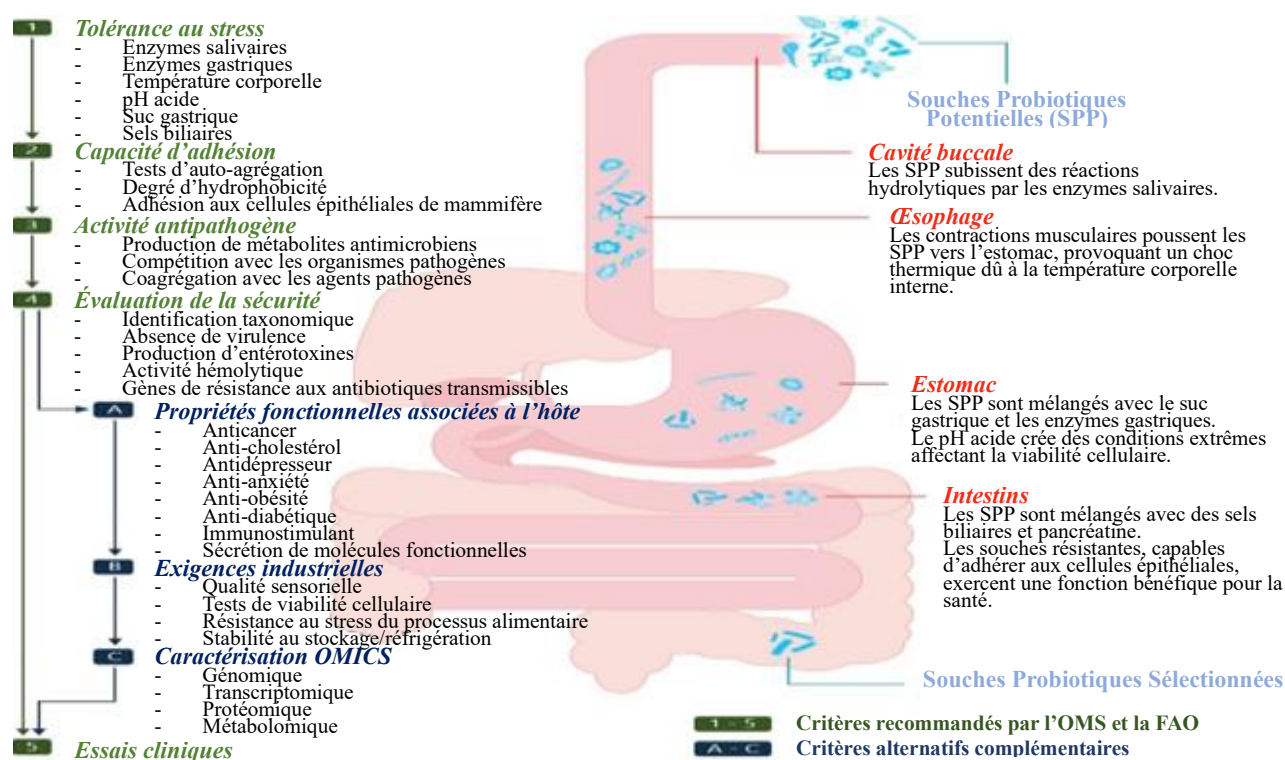


Figure 2.1 : Critères de screening des bactéries probiotiques [63]

2.1.2 Microbiote intestinal et probiotiques

Le microbiote est défini comme l'ensemble des micro-organismes, incluant les bactéries, les virus et certains eucaryotes unicellulaires, qui résident dans un environnement particulier [68]. Le microbiote intestinal, anciennement appelé microflore intestinale, constitue la plus grande communauté microbienne chez l'homme [69].

Un microbiote intestinal équilibré joue un rôle crucial dans la physiologie et la survie de l'hôte, notamment par la transformation des glucides alimentaires non digestibles en acides gras à chaîne courte et autres métabolites. Ces composés constituent une source d'énergie pour l'hôte et exercent une fonction régulatrice contribuant à la prévention de diverses pathologies [14, 70].

Les avancées récentes des technologies de séquençage de nouvelle génération ont considérablement optimisé la recherche en métagénomique, élargissant ainsi la compréhension du microbiome et de ses interactions symbiotiques avec l'organisme humain. C'est pourquoi certains chercheurs qualifient le microbiote intestinal de « notre organe négligé » [68].

Le maintien de l'équilibre microbien intestinal permet de prévenir et d'atténuer plusieurs troubles, notamment :

- Les pathologies inflammatoires systémiques [71]
- La dépression et l'anxiété [72]
- Les maladies cardiovasculaires [73]
- L'obésité [74]
- Les diarrhées [75]
- Les maladies métaboliques [76]

La colonisation intestinale par le microbiote commence dès la naissance et se stabilise habituellement pendant l'enfance (voir figure 2.2) [77]. Le microbiote d'un adulte abrite plus de 1000 espèces microscopiques distinctes, comptant entre 10^{12} et 10^{14} microorganismes, avec un poids estimé entre 1 à 2 kg [78]. Néanmoins, différents éléments peuvent affecter sa diversité, comme l'environnement, l'alimentation, le système immunitaire, les pathologies et le recours aux antibiotiques [79]. D'après D'Argenio et Salvatore [68], le microbiote intestinal chez l'adulte est largement constitué de bactéries appartenant principalement aux phylums : *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*.

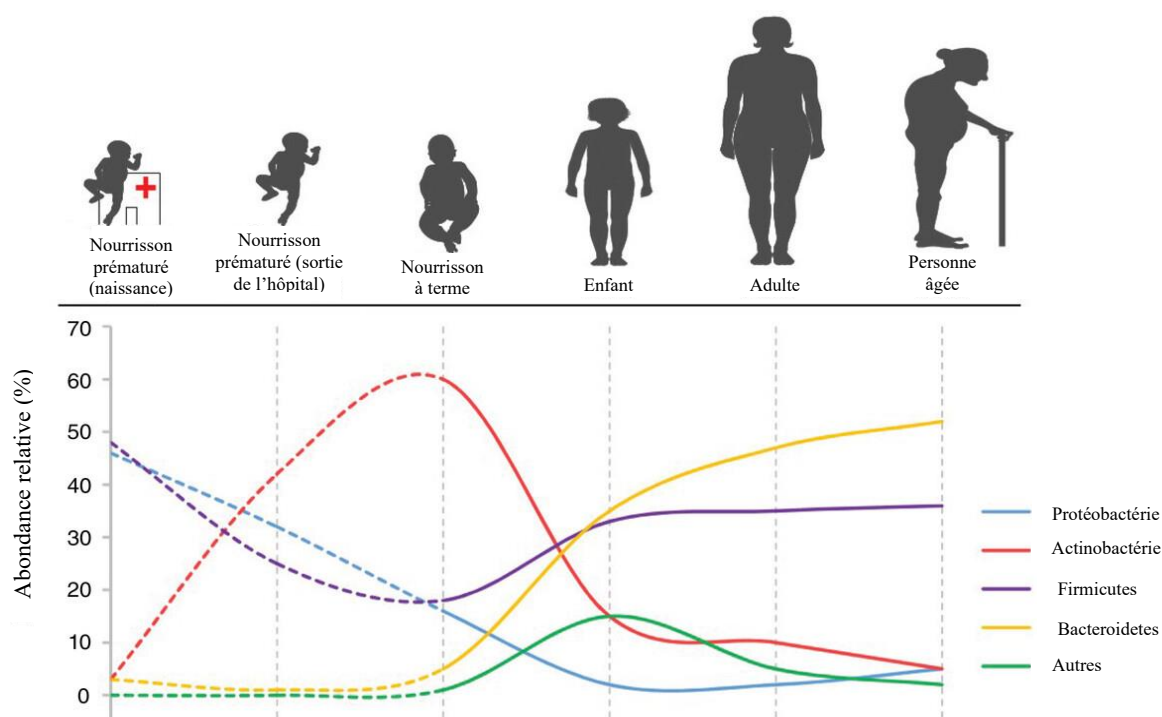


Figure 2.2 : Évolution du microbiote intestinal au cours de la vie [77].

Un déséquilibre dans la composition du microbiote intestinal (dysbiose) conduit à l'émergence de différentes maladies comme les lésions intestinales, le syndrome métabolique et le cancer, entre autres. Plusieurs éléments contribuent à ce phénomène, les antibiotiques et le stress oxydatif étant les principaux facteurs perturbateurs (figure 2.3) [14].

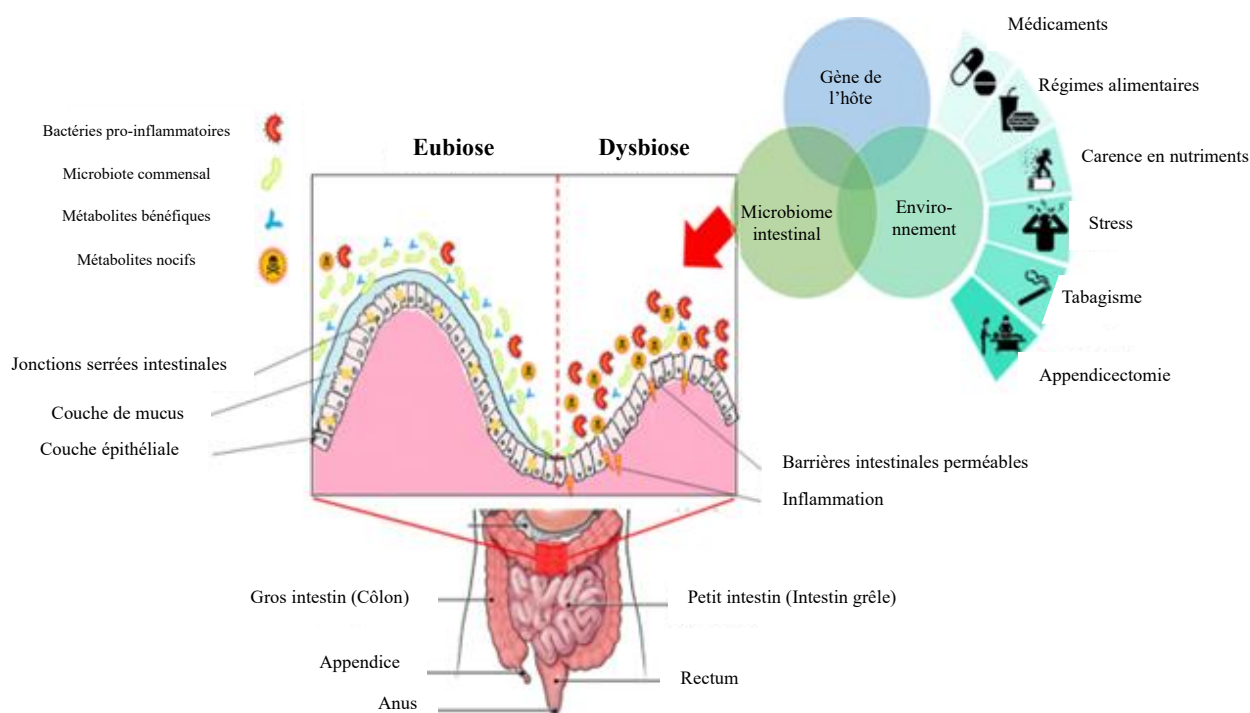


Figure 2.3 : Facteurs affectant l'équilibre du microbiote intestinal [80]

Les nutriments, les cellules de l'hôte et le microbiote intestinal entretiennent une interaction étroite qui donne naissance à une collaboration fonctionnelle. Les microorganismes du microbiote décomposent les glucides non assimilables en composés que les cellules de l'hôte peuvent utiliser. Plusieurs auteurs mettent en avant l'importance de ce lien fort entre le microbiote intestinal et la santé générale du corps. Il est nécessaire de préserver l'homéostasie du microbiote pour garantir un fonctionnement optimal dans différentes conditions physiologiques. Cette régulation implique en particulier une nutrition variée, riche en probiotiques et prébiotiques, qui contribuent à la restauration et à l'équilibre des communautés microbiennes intestinales [69].

L'impact des probiotiques est essentiellement lié à la régulation de la composition et de la fonction du microbiote résidant [81]. L'un des principes d'action clés est l'effet barrière, ou résistance à la colonisation, qui restreint la multiplication des bactéries nuisibles par différentes stratégies, comme la concurrence pour les lieux d'adhésion et la gêne de l'accrochage des pathogènes. De plus, les probiotiques jouent aussi un rôle dans la régulation du système immunitaire et dans la préservation de l'intégrité des jonctions serrées entre les cellules épithéliales de l'intestin [61].

Un équilibre du profil microbien intestinal dès le plus jeune âge est fortement associé à une santé future optimale. L'établissement précoce du microbiote par des souches de

bifidobactéries commence dès la naissance, surtout lors d'une délivrance naturelle et selon la qualité du lait maternel. Pour un enfant en bonne santé, de 1 à 12-18 mois (période d'allaitement), la flore intestinale est surtout prédominée par les bifidobactéries [82].

L'intérêt mondial pour la recherche sur les probiotiques continue de croître. Malgré une documentation abondante de leurs effets positifs, notamment à travers des recherches *in vitro* et sur des modèles animaux, les processus d'action précis demeurent partiellement non résolus. Selon l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), il n'existe toujours pas une compréhension totale des mécanismes probiotiques jusqu'à présent [61].

2.1.3 Effets des probiotiques sur la santé digestive

L'organisme humain ou animal est constamment exposé à des agressions externes causées par des micro-organismes pathogènes. Ces derniers peuvent pénétrer dans l'organisme notamment via l'alimentation. Lorsqu'ils entrent en contact avec les muqueuses, ces microbes colonisent ces surfaces et fermentent les substrats de manière inappropriée, produisant des toxines susceptibles d'altérer la santé en provoquant divers dommages [83]. De nombreuses études ont été menées afin d'évaluer les effets préventifs et/ou thérapeutiques des bactéries probiotiques sur les troubles digestives.

2.1.3.1 Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent plusieurs affections caractérisées par une inflammation persistante du système digestif. Quatre entités majeures sont incluses sous ce terme : la colite ulcéreuse, la maladie de Crohn, la pouchite et la colite microscopique [84]. Parmi elles, la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn sont les plus fréquemment rencontrées [85, 86].

La colite ulcéreuse débute généralement au rectum et progresse vers le côlon, provoquant une ulcération de la muqueuse, des saignements rectaux, des selles fréquents, une sécrétion de mucus purulent ainsi que des douleurs abdominales basses. En revanche, la maladie de Crohn peut affecter n'importe quelle partie du tractus gastro-intestinal et se manifeste par des diarrhées fréquentes, parfois accompagnées de saignements, de douleurs abdominales, de fièvre, de fatigue et de perte de poids [85].

La cause exacte de ces deux pathologies reste mal élucidée, bien qu'une interaction complexe entre facteurs génétiques, environnementaux, immunitaires et des altérations du microbiote intestinal semble impliquée [86]. Des bactéries pathogènes spécifiques telles que

Salmonella, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Clostridium difficile* et *Escherichia coli* peuvent également jouer un rôle déclencheur. Le traitement conventionnel repose sur l'usage de corticostéroïdes, d'aminosalicylates, d'antibiotiques et d'immunosuppresseurs [87]. Toutefois, les probiotiques représentent une alternative thérapeutique prometteuse. Leur efficacité a été démontrée à travers de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal [88-91]. Une méta-analyse de Derwa et al [86] indique que les probiotiques sont bien tolérés chez l'homme et pourraient remplacer partiellement les traitements à base de 5-aminosalicylates dans le cas de la colite ulcéreuse. En revanche, les preuves concernant leur efficacité pour la maladie de Crohn restent insuffisantes.

2.1.3.2 Diarrhées infectieuses

Les diarrhées infectieuses sont causées par des virus, bactéries ou protozoaires [92]. Les nouveau-nés et les animaux pré-sevrés sont particulièrement vulnérables aux infections bactériennes pathogènes [93]. Ces infections représentent un facteur majeur de morbidité et de mortalité, surtout dans les pays en développement [94].

D'après une étude de Toualbia et al [95], *Lactobacillus plantarum*, isolé du lait camelin, a montré une activité antagoniste contre des bactéries responsables de diarrhées infantiles, telles que *Escherichia fergusonii*, *Salmonella enterica ssp. diarizonae* et *Proteus mirabilis*. L'implication de *E. coli* et de *Salmonella* a également été confirmée par d'autres travaux [96, 97]. Ces agents pathogènes, souvent d'origine alimentaire, prolifèrent dans un intestin appauvri en probiotiques.

Les bactéries lactiques exercent une action antibactérienne contre ces pathogènes. Ainsi, leur capacité d'inhibition figure parmi les critères de sélection clés des souches probiotiques, en particulier celles utilisées contre les diarrhées infantiles. De nombreuses études ont corroboré cette propriété protectrice [75, 95, 98].

Les traitements conventionnels des infections intestinales s'appuient principalement sur des antibiotiques, antifongiques ou antiviraux [99]. Toutefois, leur passage dans l'intestin perturbe souvent la flore et peut induire une dysbiose, se traduisant par des troubles digestifs comme les diarrhées ou les ballonnements [100]. La disparition de ces symptômes est généralement associée à une reconstitution du microbiote. C'est pourquoi la consommation d'aliments fermentés riches en probiotiques, de fruits et légumes riches en prébiotiques, ou encore d'alicaments combinés, est fortement recommandée [101].

Par ailleurs, l'usage abusif et non ciblé des antibiotiques, y compris en agriculture, aquaculture et médecine humaine, contribue à l'émergence de résistances bactériennes. Cette pratique favorise aussi l'accumulation de résidus dans les sols, les rivières et les eaux usées. Chaque écosystème constitue une niche propice à la sélection de bactéries résistantes [102]. Le phénomène est aggravé par le transfert horizontal de gènes de résistance, rendant la maîtrise des infections encore plus difficile [59, 103].

Bien que les traitements classiques demeurent essentiels, la montée des résistances souligne la nécessité de développer des approches alternatives. À ce titre, des travaux récents comme ceux de Cheruvari et Kammara [4] se sont orientés vers la découverte de métabolites bioactifs issus de micro-organismes capables de lutter contre les pathogènes multirésistants.

2.2 Exploitation industrielle et technologique des bactéries lactiques

La fermentation et la conservation des aliments reposent depuis longtemps sur l'activité des bactéries lactiques, dont le rôle a été initialement découvert de manière fortuite. Ces microorganismes sont aujourd'hui reconnus comme un groupe majeur dans l'industrie agroalimentaire, en raison de leur rôle multifonctionnel dans de nombreuses applications [104]. Par ailleurs, les bactéries lactiques métabolisent les substrats présents dans les matières premières (glucides, protéines, lipides) et confèrent ainsi des propriétés organoleptiques spécifiques aux produits fermentés, en générant des composés aromatiques et texturants [57].

2.2.1 Utilisation dans les produits laitiers fermentés

Le lactose est le sucre le plus abondant dans le lait et constitue la principale source d'énergie et de carbone pour la croissance des bactéries lactiques. Toutefois, celles-ci peuvent également assimiler d'autres substrats comme les acides aminés et les acides gras, ce qui favorise le développement d'arômes et de textures spécifiques [105].

Toutes les bactéries lactiques partagent la capacité commune de produire de l'acide lactique à partir de la fermentation des glucides [104]. Sur le plan industriel, on distingue deux catégories de souches : les bactéries lactiques de démarrage (SLAB), responsables du déclenchement de la fermentation, et les souches non starters (NSLAB), impliquées dans d'autres activités telles que la production d'enzymes ou de bactériocines. Lors de la transformation du lait, l'accumulation d'acide lactique entraîne une baisse du pH, ce qui modifie la structure physique du lait [106].

Le yaourt est habituellement produit par l'ajout de ferments contenant *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. D'autres souches telles que *Leuconostoc* et *Lactococcus lactis*, identifiées grâce aux avancées en microbiologie, contribuent à l'arôme du produit. Ce dernier est principalement dû à l'acétaldéhyde, avec une concentration variant entre 2,0 et 41 mg/kg, accompagné de diacétyl, acétoïne et 2,3-butanediol, qui confèrent une note beurrée caractéristique [105, 107]. Par ailleurs, ces souches influencent également la texture du produit, modifiant la cohésion, la viscosité et la consistance [108, 109]. Ces dernières décennies, la production de yaourts à base de probiotiques connaît une croissance constante, favorisant le développement de produits laitiers fonctionnels.

Concernant les fromages et autres produits laitiers fermentés, les ferments sont sélectionnés en fonction du type de produit fini. Chaque type de fromage possède un microbiote spécifique. Généralement, les micro-organismes utilisés sont ceux responsables de la fermentation (acidification) et/ou de l'activité protéolytique et lipolytique [110]. Le système protéolytique, impliqué dans la dégradation de la caséine, fournit aux cellules les acides aminés essentiels durant leur croissance dans le lait et joue un rôle industriel majeur en contribuant au développement des propriétés organoleptiques des produits laitiers fermentés [111]. En production fromagère, une collection de micro-organismes (champignons et bactéries) est souvent utilisée en association, à condition qu'il n'existe pas d'activité antagoniste entre eux [112].

Par exemple, dans la fabrication du camembert, deux types de ferments sont ajoutés : ceux responsables de la fermentation, principalement composés de *Lactococcus lactis ssp lactis* et *ssp cremoris*, et ceux d'affinage, comprenant des champignons responsables de la croûte tels que *Penicillium camemberti* (ou *candidum*) et *Geotrichum candidum*. D'autres souches, telles que *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus plantarum*, peuvent être ajoutées pour renforcer les caractéristiques organoleptiques [113]. En revanche, les fromages de type gruyère sont produits à partir d'un mélange de bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus*), de bactéries propioniques (*Propionibacterium freudenreichii* ou *Propionibacterium jensenii*), ainsi que de ferments d'affinage tels que *Brachybacterium tyrofermentans* [114].

En ce qui concerne les matières grasses d'origine laitière, les ferments utilisés possèdent une activité lipolytique, comme c'est le cas pour *Lactocaseibacillus paracasei* [115]. La

dégradation des triglycérides en acides gras libres confère des arômes caractéristiques au beurre ou à la crème fraîche [105].

La contribution réelle des bactéries lactiques dépend de leur capacité métabolique à convertir les composants alimentaires en divers composés, notamment par la production d'arômes in situ, ainsi que de leur contribution relative par rapport à d'autres micro-organismes ou enzymes simultanément actifs dans l'aliment [116]. Afin d'assurer l'efficacité des bactéries lactiques lors des processus de transformation, il est primordial de garantir que le produit cru soit exempt de substances antimicrobiennes, notamment de résidus d'antibiotiques [117].

En Algérie, les ferments utilisés dans les industries de transformation laitière sont majoritairement importés. Plusieurs études ont été menées afin d'isoler des souches autochtones et d'évaluer leur potentiel technologique et probiotique [118-121].

La mise en place d'une base de données nationale recensant ces souches autochtones, dotées de propriétés fonctionnelles ou technologiques, apparaît cruciale. Cela permettrait d'étudier leurs interactions et de développer des ferments et/ou compléments adaptés aux matrices locales. Un tel effort contribuerait à réduire la dépendance à l'importation et favoriserait l'innovation dans les aliments fonctionnels.

2.2.2 Propriétés fonctionnelles utiles à l'industrie

Pour être utilisés dans les aliments fonctionnels, les micro-organismes doivent être probiotiques et sûrs pour la consommation humaine [122]. Les probiotiques participent activement à la fabrication de produits fermentés à valeur ajoutée. Leur aptitude à survivre dans des conditions extrêmes du tube digestif, notamment l'acidité gastrique, leur confère une résistance aux contraintes rencontrées lors des processus de transformation [123]. L'hydrophobicité et l'auto-agrégation sont deux propriétés clés qui assurent leur viabilité dans les produits finis et pendant le stockage, particulièrement important dans la transformation laitière où le lactosérum est majoritairement éliminé [124, 125].

Les bactéries lactiques présentent des profils fermentaires variés. Afin de déterminer les substrats glucidiques assimilés par les souches à potentiel technologique ou fonctionnel, la galerie miniaturisée API 50 CH, comprenant 49 tests, est couramment utilisée [126]. Le choix des souches dépend alors de la composition de la matrice alimentaire, de leur profil fermentaire, ainsi que de leur capacité à métaboliser protéines et lipides.

2.2.3 Sécurité microbiologique des souches

En plus de leurs propriétés probiotiques ou technologiques, les souches de bactéries lactiques doivent répondre à des critères stricts de sécurité avant tout usage agroalimentaire ou pharmaceutique. Selon l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) [127], les critères de sécurité indispensables incluent :

2.2.3.1 Sensibilité aux antibiotiques :

Les souches utilisées ne doivent pas porter de résistances transmissibles. La présence de gènes de résistance dans les probiotiques peut constituer un réservoir au niveau intestinal, favorisant leur transfert aux pathogènes cohabitant, ce qui peut entraîner de graves conséquences cliniques [128]. L'évaluation de la sensibilité antibiotique s'effectue généralement par la technique de diffusion sur gélose ou en milieu liquide (CMI), avec comparaison des résultats aux normes publiées par des organismes de contrôle tels que l'institut des normes cliniques et de laboratoire (CLSI) et l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA).

2.2.3.2 Activité hémolytique, DNase et gélatinase

Certaines souches peuvent produire des enzymes extracellulaires délétères pour l'hôte notamment L'hémolysine, DNase et gélatinase [129]. Ces activités sont évaluées par des tests phénotypiques reposant sur l'incorporation de substances spécifiques (sang, ADN, gélatine) dans un milieu gélosé, complétés si nécessaire par des révélateurs afin de détecter l'hémolyse, l'activité DNase ou gélatinase.

2.2.3.3 Production d'amines biogènes

Les amines biogènes, issues de la dégradation des acides aminés, peuvent être toxiques lorsqu'elles dépassent certains seuils. Parmi celles les plus étudiées dans les denrées alimentaires figurent l'histamine, la tyramine, la putrescine et la cadavérine. Il est souhaitable que les bactéries lactiques soient dépourvues des décarboxylases responsables de leur formation. Toutefois, la présence de la tyrosine décarboxylase ne constitue pas un danger potentiel pour les souches d'*Enterococcus* à effet probiotique [130]. Plusieurs méthodes permettent de détecter cette activité, notamment des techniques de quantification directe en milieu liquide et des tests qualitatifs sur gélose additionnée de l'acide aminé cible et d'un indicateur coloré, la libération d'amines biogènes alcalinisant le milieu.

2.2.3.4 Risques liés à *Enterococcus faecium*

Les souches d'*Enterococcus faecium* se répartissent en deux catégories principales : celles pathogènes, généralement isolées à partir d'échantillons cliniques de patients, et celles probiotiques, d'origine alimentaire ou issues d'organismes en bonne santé [131, 132]. Ces bactéries, habituellement commensales du microbiote intestinal, sont néanmoins connues pour leur forte propension à acquérir et transférer des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques [133].

La résistance à la vancomycine, particulièrement élevée chez certaines souches d'*Enterococcus*, complique significativement leur prise en charge thérapeutique [134]. La présence de gènes de virulence accroît l'agressivité des souches, ces derniers codant notamment pour la production d'enzymes extracellulaires telles que la gélatinase (gelE), l'hyaluronidase (hyl) et la cytolysine (cyl). Par ailleurs, certains gènes favorisent l'expression de protéines de surface facilitant l'adhésion et la formation de biofilms sur les sites d'action, à l'instar de la protéine de surface entérocoque (esp), qui permet l'adhésion à l'épithélium, et de l'antigène spécifique d'endocardite (efaAfm), impliqué dans l'adhésion endothéliale et le développement d'endocardites [135].

Il est donc essentiel de rechercher ces gènes à l'aide de méthodes moléculaires, notamment la PCR avec amorces spécifiques. La combinaison de techniques phénotypiques et génotypiques permet une évaluation plus fiable du profil de sécurité. Certains gènes, bien que présents, peuvent être réprimés et indétectables par les tests classiques, mais peuvent se réactiver dans certaines conditions. Ainsi, il est recommandé de compléter ces analyses par la PCR et le séquençage génomique complet (WGS).

2.2.4 Propriétés de bio-conservation

Les techniques les plus couramment employées pour la conservation des denrées alimentaires comprennent les méthodes chimiques, basées sur l'utilisation d'acides organiques synthétiques, ainsi que les méthodes physiques telles que les traitements thermiques (pasteurisation, stérilisation), les modifications de l'atmosphère dans les emballages par injection de dioxyde de carbone (CO₂) et d'azote (N₂) afin de limiter la prolifération des micro-organismes aérobies stricts, l'ionisation, ainsi que des approches innovantes telles que la nano-conservation [136]. Cependant, les avancées biotechnologiques ont mis en évidence les effets délétères de ces méthodes. Les additifs chimiques, omniprésents dans les aliments, peuvent entraîner un dépassement systématique

de la dose journalière admissible (DJA) pour chaque substance, induisant ainsi des toxicités chroniques. Par ailleurs, les traitements physiques modifient souvent la composition nutritionnelle des aliments, compromettant leurs propriétés fonctionnelles [137].

Parmi les approches émergentes visant à pallier ces limitations tout en garantissant la qualité des produits et la sécurité alimentaire, la bio-conservation occupe une place prépondérante. Cette méthode repose sur l'utilisation de micro-organismes vivants et/ou de leurs métabolites sécrétés pour inhiber la prolifération des agents responsables de la détérioration ou pathogènes [138]. Selon JORA, les bactéries pathogènes les plus fréquemment recherchées dans les denrées alimentaires sont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella*. Plusieurs études ont été réalisées pour contrôler ces bactéries indésirables par l'introduction de bactéries lactiques dans diverses matrices alimentaires. À titre d'exemple, une étude algérienne menée par Madi et Boushaba [139], a mis en évidence l'effet bio-conservateur des bactéries lactiques autochtones isolées du lait cru de vache contre *Staphylococcus aureus* dans le fromage. Par ailleurs, Kaveh et al [140] ont étudié la conservation de la viande et des produits carnés, tandis que Gómez-Sala et Herranz [141], ont exploré l'utilisation des bactéries lactiques dans les produits de la mer .

Les bactéries lactiques présentant une activité antimicrobienne sont capables de produire diverses substances bioactives agissant à différents niveaux (paroi cellulaire, ADN, etc.). Parmi ces métabolites figurent principalement les acides organiques (lactique, acétique et propionique), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les bactériocines. Ces composés, en particulier les bactériocines, exercent une action bactéricide ou bactériostatique sur un large spectre de micro-organismes. Leur mécanisme d'action repose sur la formation de pores membranaires, la dégradation de l'ADN cellulaire, la perturbation induite par le clivage spécifique de l'ARNr 16S, ainsi que l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane, comme illustré dans la figure 2.4 [142].

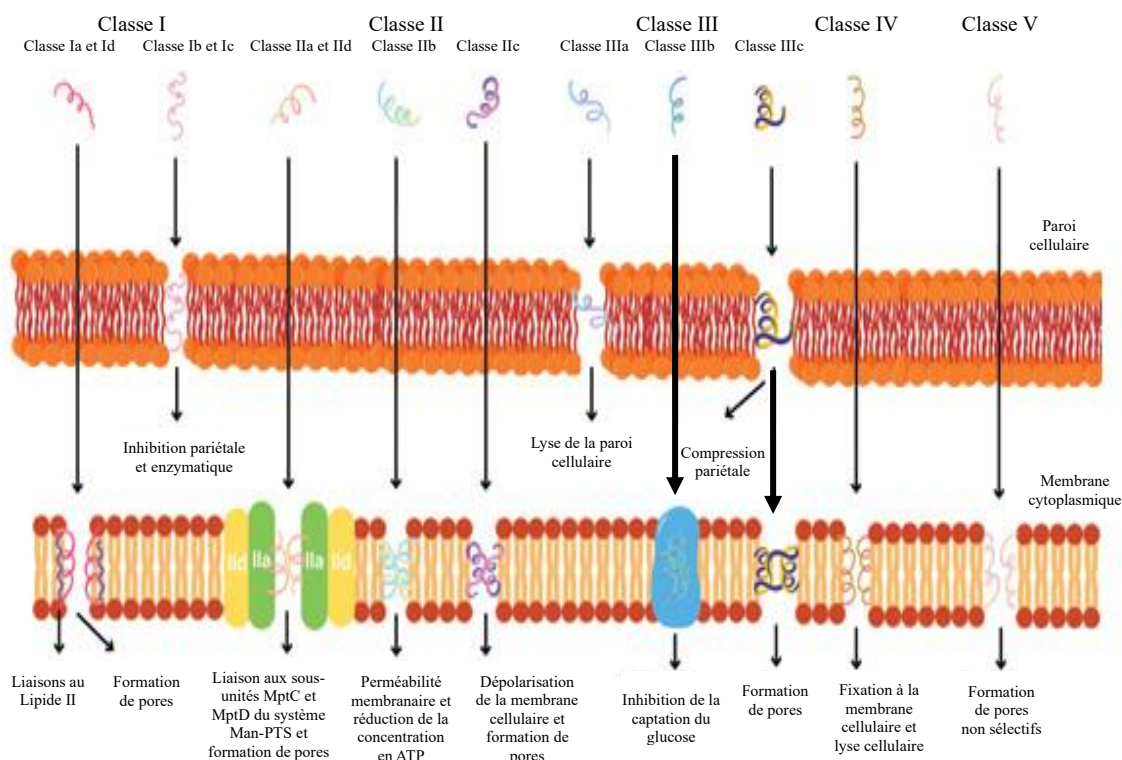


Figure 2.4 : Mode d'action des bactériocines en tant qu'agents antimicrobiens. Man-PTS : phosphotransférase system spécifique au mannose ; MptC et MptD : sous-unités membranaires de ce système ; ATP : adénosine triphosphate. [142].

2.2.5 Intérêt stratégique de la valorisation des souches locales

2.2.5.1 Réduction de la dépendance aux cultures importées

Les ferments utilisés dans l'industrie de transformation laitière sont majoritairement importés. Or, ces cultures, n'étant pas autochtones, peuvent présenter une adaptation limitée aux spécificités des matrices alimentaires locales [143]. Le développement de ferments à base de souches autochtones constitue une stratégie efficace pour réduire les coûts liés à l'importation, tout en renforçant l'autonomie des chaînes de production locales et en assurant une souveraineté biotechnologique.

2.2.5.2 Valorisation du patrimoine laitier algérien

Plusieurs produits laitiers fermentés locaux (Raïb, Lben, S'men, Zebda, etc.) possèdent une richesse microbienne unique [144, 145]. Industrialiser leur production avec des ferments adaptés préserverait leurs qualités traditionnelles [119, 146].

2.2.5.3 Développement de probiotiques locaux

De nombreuses souches autochtones présentant un potentiel probiotique ont été isolées à partir de divers substrats, notamment des produits laitiers fermentés [11, 147-149]. Ces souches pourraient être intégrées dans des matrices alimentaires, en privilégiant le maintien de leur origine d'isolement, afin de produire des aliments fonctionnels locaux ainsi que des compléments alimentaires probiotiques destinés à restaurer la flore intestinale, notamment après une antibiothérapie [150]. Il convient de souligner que les compléments probiotiques actuellement disponibles en Algérie sont importés. Le développement local dans ce domaine permettrait ainsi de réduire la dépendance à l'importation de ces produits.

PARTIE 2

EXPÉRIMENTATION

CHAPITRE 3

3 MATÉRIEL ET METHODES

Lieux de réalisation de la partie expérimentale

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée dans plusieurs laboratoires spécialisés, chacun contribuant à une étape spécifique du travail :

- Le Laboratoire d'Hygiène de la Wilaya de Blida a été mobilisé pour l'isolement, la purification ainsi que la conservation des isolats lactiques.
- La préparation des milieux de culture a été effectuée au Laboratoire de Contrôle de la Qualité et de la Répression des Fraudes de la Wilaya de Blida, ainsi qu'au laboratoire privé de contrôle de qualité et de conformité « ALTESSE LAB ».
- L'étude de l'activité antibactérienne a été menée au Laboratoire Central de Biochimie et de Microbiologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Frantz Fanon de Blida.
- L'évaluation phénotypique de la sécurité des souches lactiques a été réalisée au Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie de l'Établissement Hospitalier Spécialisé dans la Transplantation d'Organe et de Tissus (EHS-TOT) de Blida.
- L'identification protéomique par spectrométrie de masse MALDI-TOF MS a été effectuée au Centre de Recherche en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) situé à Bouismail, Tipaza.
- L'identification génotypique a été réalisée au laboratoire Gène Life Science (GLS) de Sidi Bel Abbès.
- Enfin, l'évaluation moléculaire de l'innocuité des souches a été menée au Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt) de Constantine.

Organisation de l'expérimentation

Notre étude s'est structurée en neuf étapes principales :

1. Isolement, purification et conservation des souches lactiques.
2. Criblage des isolats selon leur activité antibactérienne à l'encontre de quatre pathogènes alimentaires.
3. Identification protéomique des isolats sélectionnés par MALDI-TOF MS.
4. Évaluation phénotypique de la sécurité des souches sélectionnées.

5. Criblage des souches selon leur potentiel fonctionnel.
6. Confirmation génotypique de l'identité des souches retenues.
7. Évaluation génotypique de la sécurité des souches retenues.
8. Détermination du profil fermentaire des sucres chez les souches retenues.
9. Analyse statistique des résultats.

3.1 Matériel

3.1.1 Matériel biologique

3.1.1.1 Lait cru

Le lait cru a été prélevé à partir d'animaux divers, notamment la chamelle, la vache, la chèvre et la brebis, élevés en Algérie (voir Tableau 3.1). Avant la traite, les mains du fermier ainsi que les mamelles des animaux ont été soigneusement nettoyées à l'eau savonneuse, rincées à l'eau propre, puis séchées à l'aide d'une lingette stérile. Les trois premiers jets de lait ont été écartés afin de réduire la contamination. Le lait a ensuite été recueilli à raison de 100 mL dans des flacons en verre stériles d'une capacité de 250 mL. [151].

Après la collecte, les échantillons ont été placés dans une glacière afin de maintenir une basse température, puis transportés directement au laboratoire pour analyse.

Tableau 3.1 : Répartition des échantillons de lait cru selon les animaux et les régions.

Animaux	Régions	Identifiant	Nombre d'échantillons
Chamelle	Boughezoul, Médéa	LMBM	5
	Al-Mosran, Djelfa	LMMD	5
Vache	Berbissa, Chaiba, Tipaza	LVCB	5
	Ben Saleh, Blida	LVBB	5
Chèvre	Ben Saleh, Blida	LCBB	5
Brebis	Ben Saleh, Blida	LBBB	5

3.1.1.2 Souches de références

Listeria monocytogenes ATCC 7644 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont été fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA).

Escherichia coli ATCC 8739 et *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype *aboney* ATCC 6017 ont été fournies par le Centre Hospitalier Universitaire (CHU) « Frantz Fanon » de Blida.

3.1.2 Matériel non biologique

- Milieux de culture (Appendice B).
- Réactifs pour la coloration de GRAM (Appendice C).
- Réactifs de MALDI-TOF.
- Réactifs pour la PCR et séquençage de gène de l'ARNr 16s.

3.2 Méthodes

3.2.1 Isolement, purification et conservation des souches lactiques

3.2.1.1 Enrichissement

Afin de garantir la présence de la flore lactique mésophile et thermophile, un enrichissement a été réalisé directement sur le lait cru, comme illustré à la figure 3.1. Les échantillons ont été incubés dans des étuves réglées respectivement à 37 °C et 44 °C, jusqu'à coagulation du lait [152].

3.2.1.2 Isolement et conditions de culture

Avant l'isolement, des dilutions décimales ont été préparées dans de l'eau physiologique stérile (0,9 % NaCl). À l'aide d'une pipette graduée stérile, 1 mL de lait coagulé a été transféré dans un tube contenant 9 mL d'eau physiologique, correspondant à la dilution 10^{-1} . Cette technique a été répétée successivement jusqu'à la dilution 10^{-9} , conformément à l'étape illustrée à la figure 3.1.

Pour isoler la majorité des genres lactiques présents et obtenir des boîtes de culture peu chargées, 1 mL des cinq dernières dilutions (de 10^{-5} à 10^{-9}) a étéensemencé en double sur les milieux MRS (TM MEDIA, Inde) [153] et M17 (LIOFILCHEM, Italie) [154] (voir Appendice A). L'incubation a été effectuée à 37 °C et 44 °C, en conditions aérobies et anaérobies. Les conditions de culture sont détaillées dans le Tableau 3.2.

Les boîtes présentant des colonies bien isolées et distinctes ont été sélectionnées. Chaque colonie a été purifiée par des repiquages successifs sur gélose et bouillon, alternativement, jusqu'à obtention d'une culture pure, confirmée par coloration de Gram.

Tableau 3.2 : Milieux et conditions de culture des souches lactiques.

Milieux	T(°C) / D(H)	Genre bactérien	Condition de respiration	Références
MRS	44°C / 24-48H	<i>Lactobacillus thermophiles</i>	Anaérobiose	[139, 155]
	37°C / 24-72H	<i>Lactobacillus mésophiles</i>		[24]
		<i>Pediococcus</i>	Aérobiose	[156]
		<i>Lactococcus</i>		[157]
		<i>Enterococcus</i>		[130, 157]
M17	44°C / 72H	<i>Streptococcus Thermophilus</i>	Aérobiose	[139, 155]
		<i>Enterococcus</i>		[27]
	37°C / 24-72H	<i>Lactococcus</i>		[157]
		<i>Enterococcus</i>		[27, 157]

3.2.1.3 Etude des caractères morphologiques et biochimiques

Afin de différencier les isolats lactiques des autres catégories bactériennes, l'étude des caractères morphologiques a été réalisée conformément aux recommandations de Schillinger et Lücke [158], González et al [159] et Ludwig et al [22].

Macroscopiquement, les colonies lactiques se présentent sous une forme lenticulaire, avec un contour généralement régulier, une couleur blanchâtre à jaunâtre, et une taille variante entre 1 et 5 mm selon les espèces. Microscopiquement, ces bactéries sont Gram-positives et peuvent être cocciques, bacillaires ou coccobacillaires. Leur mode d'arrangement varie selon les genres : isolées (*Lactobacillus*, *Enterococcus*), en paires (*Lactococcus*, *Enterococcus*), en tétrades (*Pediococcus*), en courtes chaînes (*Lactobacillus*) ou en longues chaînes (*Streptococcus thermophilus*). Elles ne forment pas de spores.

Cependant, ces critères morphologiques ne suffisent pas à identifier de manière certaine les bactéries lactiques, car d'autres espèces présentent des caractéristiques similaires sans appartenir à ce groupe. Par conséquent, des tests complémentaires ont été réalisés, notamment le test de la catalase (avec du H₂O₂ à 3 %) et le test d'oxydase, afin de confirmer l'appartenance des isolats aux bactéries lactiques.

3.2.1.4 Conservation des isolats présélectionnés

La conservation des isolats lactiques a été effectuée selon deux méthodes. La première méthode, destinée à la conservation à court terme, consiste à stocker les isolats à 4 °C sur gélose sélective inclinée, avec un repiquage effectué toutes les quatre semaines [155].

La seconde méthode, utilisée pour la conservation à long terme, implique le stockage des isolats dans des tubes Eppendorf à -20 °C, comme représenté dans la figure 3.1. Les cultures jeunes (18 heures) sont conservées dans leurs bouillons sélectifs additionnés de 30 % de glycérol (700 µL de culture en bouillon + 300 µL de glycérol) [160], ce qui permet de préserver la viabilité des souches sur une période prolongée (jusqu'à 18 mois).

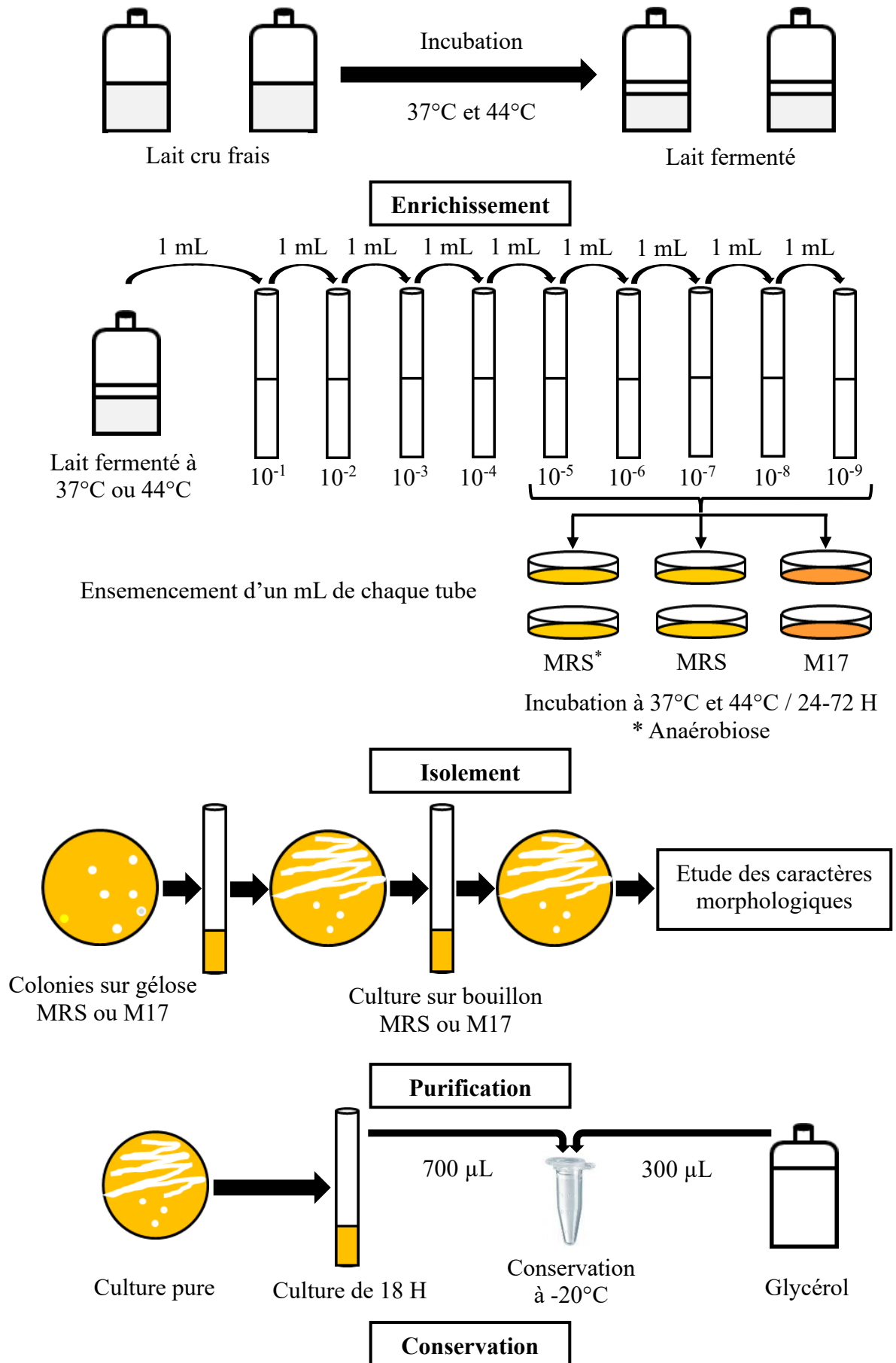


Figure 3.1 : Schéma d'isolement, purification et conservation des souches lactiques.

3.2.2 Criblage antibactérien des souches lactiques

3.2.2.1 Souches indicatrices

L'activité antibactérienne des isolats lactiques a été évaluée vis-à-vis des principaux pathogènes fréquemment rencontrés dans les denrées alimentaires, notamment le lait et ses dérivés, responsables de toxi-infections alimentaires. À cet effet, deux bactéries Gram-positives (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ainsi que deux bactéries Gram-négatives (*Escherichia coli* ATCC 8739 et *Salmonella Abony* ATCC 6017) ont été sélectionnées. Ces souches de référence ont été fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie et le Centre Hospitalier Universitaire « Frantz Fanon » de Blida.

3.2.2.2 Préparation des inocula

3.2.2.2.1 Isolats lactiques

Les isolats lactiques test ont été repiqués deux fois successivement dans les bouillons MRS ou M17, avec un intervalle de 18 heures entre chaque repiquage. Ils ont ensuite été ensemencés sur gélose MRS ou M17 puis incubés dans leurs conditions optimales de culture pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir des colonies fraîches.

Après incubation, les colonies obtenues ont été prélevées puis suspendues dans de l'eau physiologique stérile (0,9 % NaCl). Les suspensions bactériennes ont été ajustées à une densité équivalente à 0,5 McFarland (DENSIMAT, Biomérieux, France), correspondant à environ 10^8 UFC/mL, en vue des analyses ultérieures.

3.2.2.2.2 Souches indicatrices

Les souches indicatrices ont été revivifiées deux fois sur bouillon TSB (LIOFILCHEM, Italie) à une température de 37°C pendant 18 heures, puis repiquées sur gélose TSA (LIOFILCHEM, Italie). À partir d'une culture jeune de 18h, des suspensions bactériennes ont été préparées dans de l'eau physiologique stérile à une densité de 0,5 McFarland ($\approx 10^8$ UFC/mL). Un millilitre de cette suspension a ensuite été dilué dans 9 mL d'eau physiologique stérile, afin d'obtenir une concentration de 10^7 UFC/mL. Puis, 1 mL de cette dilution a été incorporé dans 9 mL de gélose TSA molle (0,75 % agar p/v) pour atteindre une concentration finale de 10^6 UFC/mL (voir Figure 3.2).

3.2.2.3 Inoculation et conditions de culture

Le criblage de l'activité antibactérienne a été réalisé selon la méthode des spots, telle que décrite par Madi et Boushaba [139]. Cette méthode permet de mettre en évidence le pouvoir inhibiteur des isolats lactiques à l'aide de la technique des doubles couches.

Dans un premier temps, les isolats ont été classés en fonction du milieu et de la température d'isolement. Ensuite, 5 μL de chaque suspension lactique (10^8 UFC/ml) ont été déposés en spot (formant un diamètre d'environ 6 mm) sur la gélose MRS ou M17, préalablement coulée et séchée (5 spots par boîte). Les boîtes ont été incubées à la température optimale de croissance de chaque isolat (37 °C ou 44 °C) pendant 24 heures.

Après incubation, les spots ont été délicatement recouverts d'une couche de gélose TSA molle, en surfusion, inoculée avec chaque souche indicatrice à une concentration de 10^6 UFC/mL. Les boîtes ont alors été réincubées à 37 °C pendant 24 heures.

Les zones d'inhibition formées autour des spots ont été mesurées (y compris le diamètre du spot $\approx$ 6 mm) à l'aide d'un pied à coulisse. Un résultat a été considéré comme positif lorsque le diamètre de la zone d'inhibition (en excluant le diamètre du spot) dépassait 2 mm. L'ensemble de l'analyse a été répété deux fois pour assurer la reproductibilité des résultats (Figure 3.2).

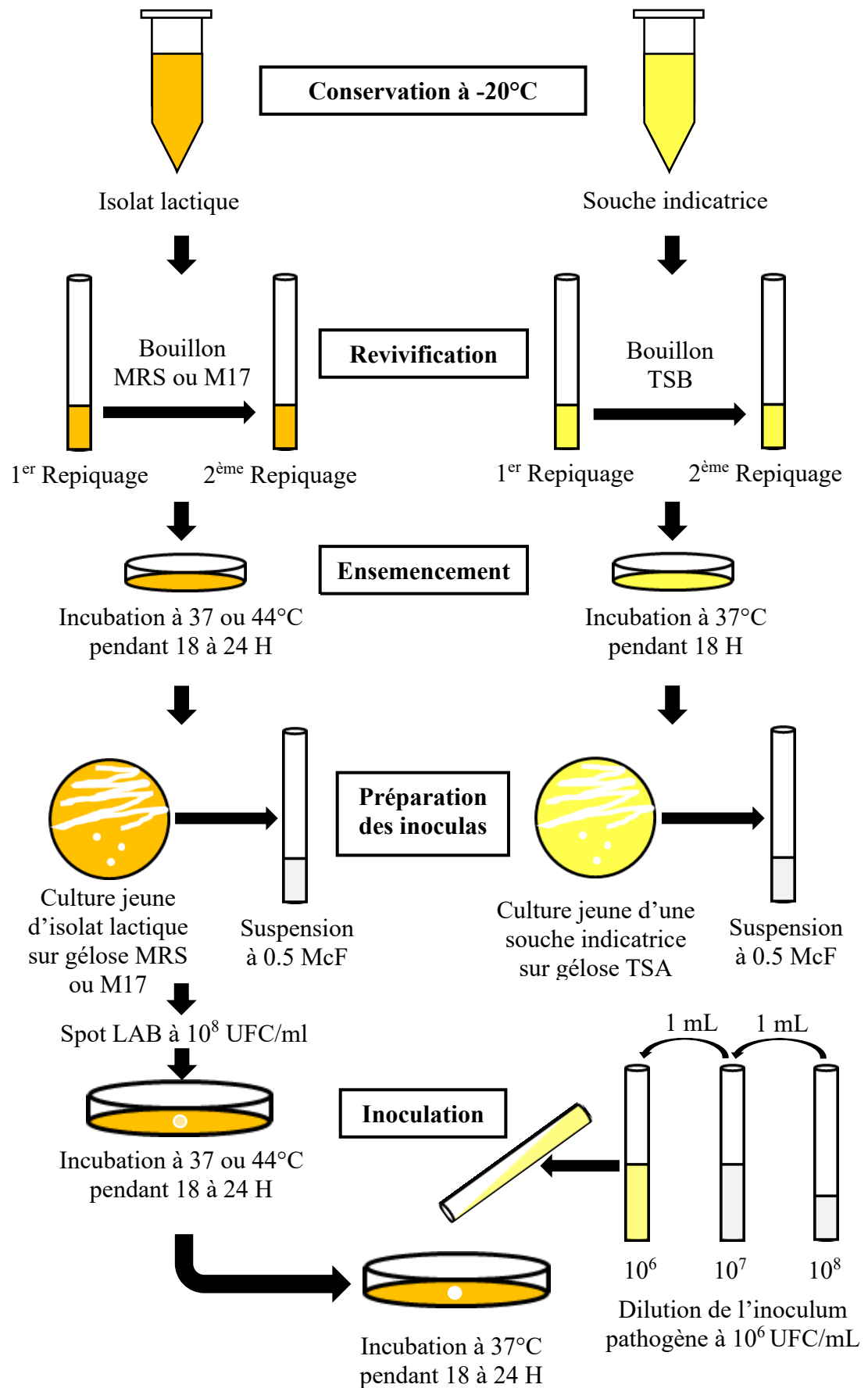


Figure 3.2 : Schéma de l'activité antibactérienne par la méthode des spots.

3.2.3 Identification protéomique des isolats criblés

Les isolats présentant une forte activité antibactérienne contre l'ensemble des pathogènes testés, sélectionnés suite à une analyse statistique, ont été identifiés par spectrométrie de masse basée sur l'analyse des protéines totales. L'identification a été réalisée à l'aide de la technique MALDI-TOF MS, en utilisant l'instrument MALDI-TOF MICROFLEX LT (BRUKER), associé aux logiciels FlexControl 3.4 et Biotyper RTC 4.0.

3.2.3.1 Méthode analytique

Chaque isolat lactique a été réactivé deux fois dans du bouillon MRS, puis ensemencé sur gélose MRS et incubé pendant 24 heures à 37 °C. Les cultures ayant montré une croissance ont été préparées selon la méthode dite « Extended method », recommandée par le CRAPC, consistant à :

- Étaler une colonie fraîche sur un puits (spot) de la cible MALDI-TOF ;
- Déposer 1 µL d'acide formique directement sur la colonie ;
- Laisser sécher à température ambiante ;
- Ajouter 1 µL de matrice HCCA (acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique) ;
- Laisser à nouveau sécher à température ambiante.

Une fois la cible préparée, elle a été insérée dans l'appareil MALDI-TOF pour l'analyse. L'appareil a été calibré à l'aide d'un étalon standard (kit d'extrait protéique d'*Escherichia coli* DH5α) contenant notamment la RNase A et la myoglobine [161]. Les spectres ont été acquis en mode linéaire. Chaque spectre généré a été automatiquement converti en une série de pics, puis comparé à ceux enregistrés dans la base de données de référence. Un score de similarité, compris entre 0,000 et 3,000, a été attribué pour évaluer la fiabilité de l'identification [162, 163].

Les scores sont interprétés comme montrés dans le Tableau 3.3

Tableau 3.3 : Interprétation des scores MALDI-TOF MS.

Valeur du score	Interprétation	Symbole	Couleur
2,300 – 3,000	Identification très probable de l'espèce	+++	Verte
2,000 – 2,299	Identification sûre du genre, probable de l'espèce	++	Verte
1,700 – 1,999	Identification probable du genre	+	Jaune
0,000 – 1,699	Identification non fiable	–	Rouge

3.2.4 Evaluation phénotypique de l'innocuité

L'innocuité des souches lactiques sélectionnées a été évaluée à travers une série de tests phénotypiques standard, incluant la sensibilité aux antibiotiques, l'activité hémolytique, la production de DNase et de gélatinase, ainsi que la formation d'amines biogènes. Ces essais visent à détecter d'éventuels facteurs de virulence ou de résistance pouvant compromettre leur usage en alimentation ou en santé.

3.2.4.1 Sensibilité des souches lactiques aux antibiotiques

La sensibilité des souches lactiques sélectionnées aux antibiotiques a été évaluée selon la méthode de diffusion sur disque décrite par Sakoui et al. [164], avec quelques modifications. Quinze antibiotiques appartenant à neuf classes différentes ont été testés. À partir d'une culture fraîche de bactérie lactique âgée de 24 heures, un inoculum a été préparé dans de l'eau physiologique stérile, standardisé à une densité équivalente à 0,5 McFarland (10^8 UFC/mL). L'ensemencement a été effectué à l'aide d'un écouvillon stérile sur des boîtes de gélose Mueller-Hinton (MH) (IPA, Algérie). Des disques d'antibiotiques commerciaux (Bioscan Industrie, Algérie) ont ensuite été déposés sur la surface (Tableau 3.4). Un disque blanc (vierge) a servi de témoin négatif. L'incubation a été réalisée à 37 °C pendant 24 heures.

Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition autour des disques ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse. L'interprétation s'est faite selon les critères du CLSI [165] pour *Enterococcus faecium* et ceux de Jawan et al. [166] pour *Lactococcus lactis ssp. lactis*, classant les souches comme sensibles (S), intermédiaires (I) ou résistantes (R). Le test a été réalisé en double afin de garantir la fiabilité des résultats.

Tableau 3.4 : Antibiotiques testés à l'égard des souches lactiques sélectionnées

Antibiotique		Abbreviation	Charge/disque (µg)
Classe	Nom		
Pénicillines	Amoxycilline	AX	10
			25
	Amoxycilline + Acide clavulanique	AMC	20/10
Aminosides	Gentamicine	GEN	10
	Amikacine	AK	30
	Kanamycine	K	30
Céphalosporines	Céfalexine	CL	30
	Céfazoline	CZ	30
	Céfotaxime	CTX	30
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	10
Glycopeptides	Vancomycine	VA	30
Macrolides	Erythromycine	E	15
Rifamycines	Rifampicine	RA	5
Phénicolés	Chloramphenicol	C	30
Tétracyclines	Tetracycline	TE	10

3.2.4.2 Activité hémolytique

L'activité hémolytique des souches lactiques a été évaluée selon la méthode décrite par Colombo et al. [167]. À partir d'une culture fraîche (24 heures) de chaque souche obtenue sur bouillon MRS, une goutte a étéensemencée par stries sur une gélose TSA additionnée de 5 % (v/v) de sang de cheval défibriné. L'incubation a été réalisée à 37 °C pendant 24 heures.

Après incubation, l'apparition d'un halo clair autour de la colonie indique une hémolyse de type β ; un halo verdâtre correspond à une hémolyse de type α ; l'absence de halo autour de la colonie traduit une absence d'activité hémolytique (hémolyse de type γ). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été utilisée comme témoin positif.

3.2.4.3 Test de DNase

L'activité DNase des souches lactiques a été évaluée par ensemencement 10 µL de chaque culture jeune (incubée à 37 °C pendant 24 h dans un bouillon MRS), par spot, sur une gélose DNase (Merck, Allemagne) additionnée de 0,005 % (p/v) de vert de méthyle (Réactifs RAL, France). L'incubation a été conduite à 37 °C pendant 48 heures [168].

La formation d'un halo clair autour de la zone d'ensemencement traduit une activité DNase positive. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a servi de souche témoin positive.

3.2.4.4 Détection de l'activité gélatinase

La capacité des souches lactiques à produire de la gélatinase a été évaluée par ensemencement, par spot, de 10 µL de chaque culture jeune (incubée à 37 °C pendant 24 h dans un bouillon MRS) sur une gélose nutritive (TM MEDIA, Inde) supplémentée en gélatine à 3 % (p/v) (Merck, Allemagne), selon la méthode de Sonei et al. [169]. Après incubation à 37 °C pendant 48 heures, la surface de la gélose a été inondée d'une solution saturée de sulfate d'ammonium (750 g/L) et laissée à température ambiante pendant 5 minutes. L'apparition d'un halo clair autour du spot indique une activité gélatinase positive. La souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été utilisée comme témoin positif.

3.2.4.5 Formation des amines biogènes

L'analyse de la formation d'amines biogènes par les souches lactiques a été réalisée selon la méthode de Bover-Cid et Holzapfel [170] en deux étapes, à partir des acides aminés histidine, tyrosine et lysine :

➤ **Première étape : stimulation de l'activité des décarboxylases**

À partir d'une culture jeune (incubée à 37 °C pendant 24 heures) obtenue sur gélose MRS, chaque souche lactique a été subcultivée successivement (cinq passages) à 1 % (v/v) dans un bouillon MRS supplémenté de 0,005 % (p/v) de pyridoxal-5-phosphate et de 0,1 % (p/v) de chaque acide aminé : tyrosine base, L-histidine monohydrochloride monohydrate et L-lysine) (Sigma-Aldrich, USA).

➤ **Seconde étape : mise en évidence des activités HDC, TDC et LDC**

Après la phase de stimulation, l'activité des enzymes histidine décarboxylase (HDC), tyrosine décarboxylase (TDC) et lysine décarboxylase (LDC) a été recherchée à travers la formation des amines biogènes correspondantes : histamine, tyramine et cadavérine.

Pour cela, 10 μ L de chaque subculture ont été déposés en double, par spot, sur une gélose décarboxylase supplémentée à 1 % du même acide aminé, ainsi que sur une gélose décarboxylase sans acide aminé (témoin négatif). L'incubation a été réalisée à 37 °C pendant 4 jours, en conditions aérobies et anaérobies.

La production d'amines biogènes a été confirmée par l'apparition d'un halo clair autour du spot pour la tyrosine, et d'un halo violet pour l'histidine et la lysine.

3.2.5 Évaluation des propriétés probiotiques des souches lactiques sélectionnées

Cette étude a été menée uniquement sur les souches présentant une forte activité antibactérienne. Elle visait à évaluer leur potentiel probiotique en analysant :

- Leur capacité à survivre dans des conditions digestives hostiles (pH acide et sels biliaires),
- Ainsi que certaines propriétés de surface cellulaire (hydrophobicité et auto-agrégation).

3.2.5.1 Résistance des souches lactiques aux conditions gastro-intestinales

Un criblage initial a été réalisé afin de déterminer la capacité des souches sélectionnées à survivre dans un environnement simulant les conditions gastriques, notamment en présence de pH acides et de concentrations croissantes de sels biliaires (voir figure 3.3).

3.2.5.1.1 Préparation des inocula

Les inocula ont été préparés selon la méthode décrite par Dinçer et Kivanç [64], avec quelques modifications. À partir de cultures pures sur gélose MRS, deux colonies ont été prélevées avec une anse de platine et transférées dans 5 mL de bouillon MRS. Après incubation à 37 °C pendant 18 heures, les cellules ont été récupérées par centrifugation (4000 rpm, 30 min, 4 °C), lavées deux fois avec de l'eau physiologique stérile, puis resuspendues et standardisées à une concentration de 5 McFarland ($\approx 10^9$ UFC/mL). Comme illustré dans la figure 3.3.

3.2.5.1.2 Tolérance aux pH acides

La tolérance des souches aux pH acides (3, 2 et 1,5) a été évaluée en double, selon la méthode d'Avaiyarasi et al. [171]. Le bouillon MRS a été ajusté au pH requis à l'aide d'une solution d'HCl 5 M, distribué en tubes de 9 mL et autoclavé à 121 °C pendant 15 minutes.

Chaque tube a été inoculé avec 1 mL de la suspension bactérienne ($\approx 10^9$ UFC/mL), de manière à obtenir une concentration finale d'environ 10^8 UFC/mL. L'incubation a été réalisée à 37 °C, et le dénombrement des cellules a été effectué aux temps T_0 , T_1 (1 heure), T_2 (2 heures) et T_3 (3 heures). A chaque temps, des dilutions décimales (10^{-1} jusqu'à 10^{-6}) ont été préparées, puis 100 μ L de chaque dilution ont été ensemencés sur gélose MRS préalablement coulée et séchée (voir figure 3.3). Après incubation à 37 °C pendant 24 à 48 heures, les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies ont été retenues pour le comptage, selon la formule suivante :

$$\text{Nombre de cellules (UFC/mL)} = \frac{N_1 + N_2}{2} * \frac{1}{v} * \frac{1}{d}$$

Où :

- N_1 et N_2 sont les nombres de colonies sur les deux boîtes retenues pour une même dilution,
- v est le volume ensemencé (0,1 mL),
- d est le facteur de dilution correspondant.

Le taux de survie (%) a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de survie (\%)} = \frac{\text{Log } N_x \text{ (UFC/mL)}}{\text{Log } N_0 \text{ (UFC/mL)}} * 100$$

Où :

- N_x est le nombre de cellules à T_1 , T_2 ou T_3 ,
- N_0 est le nombre de cellules à T_0 .

3.2.5.1.3 Tolérance aux sels biliaires

L'évaluation de la tolérance des souches aux sels biliaires a été réalisée en double, selon la méthode de Kim et al. [172]. Le bouillon MRS a été préparé avec des concentrations de sels biliaires de 0,3 %, 0,5 % et 1 % (p/v) (IPA, Algérie), réparti dans des tubes de 9 mL, puis autoclavé à 121 °C pendant 15 minutes.

Un millilitre de chaque suspension bactérienne ($\approx 10^9$ UFC/mL) a été inoculé dans chaque tube. L'incubation a été réalisée à 37 °C, et le dénombrement cellulaire a été effectué aux temps T_0 (avant incubation) et T_{24} (après 24 heures).

Comme pour le test de tolérance au pH, des dilutions décimales ont été réalisées (10^{-1} jusqu'à 10^{-6}), comme indiqué dans la figure 3.3, puis 100 μ L de chaque dilution ont étéensemencés sur gélose MRS. Après incubation à 37 °C pendant 24 à 48 heures, seules les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies ont été retenues pour le comptage.

Le taux de survie (%) a été calculé à l'aide de la même formule que pour le test de résistance au pH, en remplaçant Nx par N24 (nombre de cellules après 24 heures d'incubation).

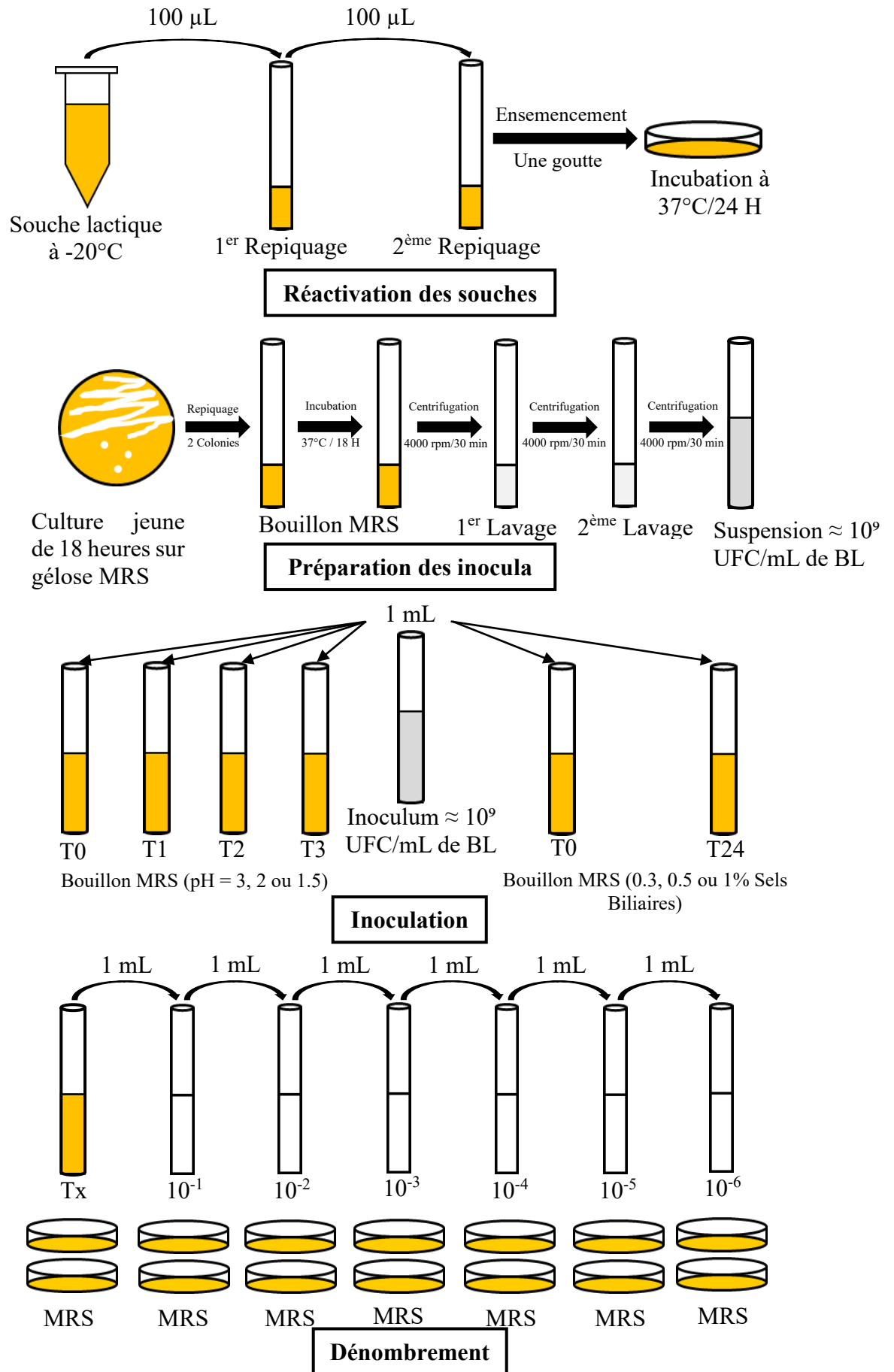


Figure 3.3 : Résistance des souches lactiques aux conditions digestives simulées

3.2.5.2 Propriétés fonctionnelles de surface cellulaire

3.2.5.2.1 Auto-agrégation

La capacité des souches retenues à s'auto-agréger a été évaluée selon la méthode décrite par Sonei et al. [169]. Les cellules ont été récoltées à partir d'une culture jeune de 18 heures par centrifugation (10 000 g, 5 minutes, 4 °C). Le culot cellulaire a été lavé deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS), puis resuspendu dans le même tampon. La densité optique (DO) à 600 nm a été ajustée à environ 0,3 (DO-0).

Quatre millilitres de cette suspension ont été vortexés pendant 10 secondes, puis incubés à 37 °C. Aux temps 3 et 24 heures d'incubation, 1 mL de la phase supérieure a été prélevé pour mesurer la DO résiduelle (DO-t).

Le taux d'auto-agrégation (%) a été calculé selon la formule suivante :

$$Auto - agrégation (\%) = \left[1 - \left(\frac{DO-t}{DO-0} \right) \right] * 100$$

Où :

- DO-0 est la densité optique initiale à T₀,
- DO-t est la densité optique à t heures (t = 3 ou 24 h).

3.2.5.2.2 Hydrophobicité

L'hydrophobicité a été évaluée par la méthode d'adhésion des microorganismes aux solvants (Microbial Adhesion to Solvents, MATS), en utilisant le xylène comme solvant apolaire.

Les cellules des souches lactiques ont été récupérées par centrifugation (10 000 g, 5 minutes, 4 °C) à partir d'une culture jeune de 18 heures. Le culot cellulaire a été lavé deux fois avec du PBS, puis resuspendu dans une solution de KNO₃ 0,1 M. La densité optique (DO) à 600 nm a été ajustée à environ 0,3 (DO-0).

Trois millilitres de cette suspension ont été mélangés avec 1 mL de xylène. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 minutes, vortexé pendant 2 minutes, puis laissé au repos pendant environ 20 minutes jusqu'à séparation des phases. Après retrait de la phase organique, la DO de la phase aqueuse restante (DO-f) a été mesurée [156].

Le taux d'hydrophobicité (%) a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Hydrophobicité (\%)} = \left(\frac{DO-0 - DO-f}{DO-0} \right) * 100$$

Où :

- DO-0 est la densité optique initiale,
- DO-f est la densité optique après retrait de la phase organique.

Les souches de bactéries lactiques présentant les meilleures aptitudes probiotiques, sur la base des tests de tolérance aux conditions gastro-intestinales et des propriétés de surface cellulaire, ont été sélectionnées pour la suite de l'étude

3.2.6 Identification génotypique des souches présentant le meilleur profil probiotique

L'identification moléculaire des souches présentant les meilleures propriétés probiotiques a été réalisée en ciblant le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S). Ce gène est largement utilisé pour l'identification bactérienne en raison de sa conservation au sein des espèces et de sa variabilité entre espèces.

L'ensemble des étapes a été mené conformément au protocole établi par le laboratoire Gene Life Science, incluant l'extraction d'ADN génomique, l'amplification du gène 16S par PCR, l'électrophorèse, la purification des amplicons, le séquençage, l'analyse bio-informatique et la soumission des séquences.

3.2.6.1 Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit GF-1 (Vivantis, Malaisie), selon les instructions du fabricant. La qualité et la concentration de l'ADN ont été évaluées par spectrophotométrie (NanoDrop™ 2000, USA), puis conservées à 4 °C jusqu'à utilisation.

3.2.6.2 Amplification du gène de l'ARNr 16S

L'amplification a été réalisée par PCR à l'aide d'amorces universelles :

- 27F : 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
- 1492R : 5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'

Le mélange réactionnel (50 µL) a été préparé selon la composition du Tableau 3.5, puis amplifié sur un thermocycleur iCycler (Bio-Rad, USA) selon le protocole suivant :

- Dénaturation initiale : 94 °C pendant 12 min
- 30 cycles :

- Dénaturation : 94 °C pendant 30 s
- Hybridation : 55 °C pendant 30 s
- Élongation : 72 °C pendant 1 min 40 s
- Élongation finale : 72 °C pendant 7 min

Tableau 3.5 : Composition du mix réactionnel pour l'amplification du gène de l'ARNr 16S

Composant	Concentration
Hot Start Taq DNA Polymerase	1.25 U
Tampon PCR	1 X
Chlorure de Magnesium (MgCl ₂)	1.5 mM
dNTP	200µM
Amorces	0.3 µM pour chaque
DNA template	25–50 ng
Eau distillée sterile (H ₂ Ods)	Compléter à 50 µL

3.2.6.3 Séparation par électrophorèse

Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % (Sigma-Aldrich, États-Unis). Un marqueur de poids moléculaire (100 bp DNA ladder, Solis Biodyne, Estonie) a été utilisé pour estimer la taille des fragments. De l'eau distillée stérile a servi de témoin négatif.

Chaque puits a été chargé avec 8 µL d'échantillon. L'électrophorèse a été réalisée dans un tampon TAE (pH 8), à 80 V pendant 20 minutes. Le gel a ensuite été coloré avec ROTI® red gel Stain (Nippon Genetics, Japon) et visualisé sous lumière UV à l'aide d'un transilluminateur.

3.2.6.4 Purification des amplicons

Les produits PCR correspondant à une taille attendue d'environ 1500 pb ont été purifiés à l'aide du kit Clean-Up (Vivantis), conformément au protocole du fabricant, en vue du séquençage.

3.2.6.5 Séquençage des amplicons purifiés

Le séquençage a été réalisé selon la méthode de Sanger. Les amplicons purifiés ont été séquencés en double, dans les directions « forward » et « reverse », dans des réactions distinctes. Chaque réaction comprenait les composants détaillés dans le Tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Composition du mix réactionnel pour le séquençage du gène de l'ARNr 16S

Composant	Concentration
dNTP	0.2 mM
ddNTP	1-2 mM chacun
Amorces	2 µL chacune
Template DNA	40 ng
BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	2 µl
Eau distillée stérile (H ₂ Osd)	Compléter à 50 µL

Le cycle de séquençage a consisté en :

- Dénaturation initiale à 96 °C pendant 1 min
- 25 cycles :
 - 96 °C pendant 10 s
 - 50 °C pendant 5 s
 - 60 °C pendant 4 s

Les produits ont été purifiés par précipitation à l'éthanol afin d'éliminer les réactifs résiduels. Le mélange de précipitation comprenait 3 µL d'acétate de sodium, 62,5 µL d'éthanol à 95 %, et 14,5 µL d'eau. Après centrifugation à 13 000 rpm pendant 15 minutes, le culot a été lavé avec 200 µL d'éthanol à 75 %, puis centrifugé à nouveau à 13 000 rpm pendant 5 minutes. L'ADN séché à l'air libre a été réhydraté dans 15 µL de formamide et déposé sur la matrice capillaire du système 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) pour la détection.

Deux séquences « forward » et deux « reverse » ont été alignées pour chaque échantillon à l'aide du logiciel Bionumerics v3.5 (Applied Maths). La qualité des séquences a été vérifiée manuellement ; les séquences dégradées ont été corrigées ou éliminées.

3.2.6.6 Identification et enregistrement dans GenBank

Les séquences obtenues ont été soumises à l'analyse BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) et comparées aux séquences de la base GenBank du NCBI (National Center for Biotechnology Information). Une identification fiable de l'espèce a été retenue lorsqu'une forte similarité a été observée avec au moins deux séquences de référence.

Les séquences spécifiques à chaque souche ont été déposées dans GenBank via le portail <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov>, et un numéro d'accès unique a été attribué à chacune.

3.2.6.7 Etablissement de l'arbre phylogénétique

Les séquences au format FASTA ont été alignées avec l'outil ClustalW. L'arbre phylogénétique a été généré à l'aide du logiciel MEGA 11, selon la méthode Neighbor-Joining. L'analyse du bootstrap a été réalisée afin d'estimer la fiabilité des branches. L'arbre obtenu illustre les relations évolutives entre les espèces identifiées.

3.2.7 Détection génotypique des gènes de virulence et de résistance

L'évaluation de la sécurité génétique des souches sélectionnées a été réalisée par PCR, en ciblant des gènes de virulence (esp, cylA, gelE, efaAfm, ace, hyl) ainsi que des gènes de résistance à la vancomycine (vanA, vanB). Les amorces spécifiques ont été conçues à partir de données issues de la littérature scientifique, en se concentrant sur les marqueurs les plus couramment recherchés chez les entérocoques à potentiel probiotique. Elles ont été synthétisées par la société MacroGen (Corée du Sud).

Les paramètres d'hybridation ainsi que la taille attendue des fragments amplifiés ont été prédits à l'aide de l'outil Primer-BLAST, disponible sur la base de données du NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

3.2.7.1 Extraction de l'ADN bactérien :

L'extraction de l'ADN a été réalisée selon la méthode décrite par Dimitrakopoulou et al. [173], avec quelques modifications. À partir d'une culture jeune sur bouillon MRS, 5 mL ont été prélevés et centrifugés à 14 000 g pendant 20 minutes. Le culot cellulaire a été récupéré, lavé deux fois avec du PBS, puis resuspendu dans 500 µL d'eau ultrapure. La suspension a été soumise à un choc thermique dans un bain-marie à 95 °C pendant 18 minutes. Elle a ensuite été centrifugée à 12 000 g pendant 5 minutes à 4 °C. Trois cents microlitres du surnageant ont été récupérés, et 2 µL ont été utilisés pour mesurer la concentration et la pureté de l'ADN à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop.

3.2.7.2 Réaction de PCR

La présence ou l'absence des gènes de virulence et de résistance à la vancomycine a été évaluée par PCR.

3.2.7.2.1 Préparation du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel a été préparé dans un volume final de 10 µL, selon la composition présentée dans le Tableau 3.7.

Tableau 3.7 : Composition du mélange réactionnel pour la détection des gènes ciblés

Composant	Concentration de la solution mère	Concentration de la solution diluée	Concentration utilisée/mix réactionnel	Volume prélevé (µL)
Tampon (inclut MgCl ₂ (20 mM))	10 X		10 X	1
dNTP	10 mM	1 mM	0.2 mM	0.2
Amorce F	100 pM	10 pM	2 pM	0.2
Amorce R	100 pM	10 pM	2 pM	0.2
ADN	50 – 100 ng		50 – 100 ng	1
Taq polymérase	5 U		0.5 U	0.1
H ₂ O Ultra pure				7.3
Volume final				10

3.2.7.2.2 Amplification des gènes cibles

L'amplification a été réalisée par PCR conventionnelle à l'aide d'un thermocycleur Bio-Rad série C1000 (USA). Les conditions d'amplification étaient les suivantes :

- Dénaturation initiale : 94 °C pendant 5 minutes.
- 35 cycles de :
 - Dénaturation : 94 °C pendant 30 secondes.
 - Hybridation : température spécifique à chaque paire d'amorces (voir Tableau3.8).
 - Élongation : 72 °C pendant 1 minute.
- Élongation finale : 72 °C pendant 7 minutes.

Tableau 3.8 : Amorces utilisées pour la détection des gènes de virulences et de résistance à la vancomycine.

Gène	Nom	Code	Amorces	Taille (pb)	Température d'hybridation	Références
Gènes de virulences	Enterococcal surface protein	esp	F : AGATTTCATCTTTGATTCTTGG R : AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510	52°C pendant 1 minute.	[174]
	Cytolysin	cylA	F : ACTCGGGGATTGATAGGC R : GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688	57°C pendant 1 minute.	[174]
	Gelatinase	gelE	F : ACCCCGTATCATTGGTTT R : ACGCATTGCTTTTCCATC	419	55.5°C pendant 1 minute.	[175]
	endocarditis antigen	efaAfm	F : AACAGATCCGCATGAATA R : CATTTCATCATCTGATAGTA	702	50°C pendant 1 minute.	[176]
	adhesion of collagen protein	ace	F : GAATTGAGCAAAAGTTCAATCG R : GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC	1008	54.1°C pendant 1 minute.	[177]
	Hyaluronidase	hyl	F : ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG R : GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	276	57°C pendant 1 minute.	[174]
Gènes de résistance	Vancomycine resistance	vanA	F : ATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATAC R : CCCCTTTAACGCTAATACGAT	1029	50°C pendant 1 minute.	[169]
	Vancomycine resistance	vanB	F : GTGACAAACCGGAGGCGAGGA R : CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA	433	63°C pendant 1 minute.	[178]

3.2.7.3 Révélation par électrophorèse

Les produits de PCR ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %, additionné de 0,01 % de colorant intercalant SYBR Safe (Invitrogen). Un marqueur moléculaire GeneRuler 50 bp et 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, Lituanie) a été utilisé pour estimer la taille des fragments.

Chaque puits a été chargé avec 5 µL de produit de PCR. La migration a été réalisée dans un tampon TBE 1X (pH 8,0), à 100 V pendant 1 h 30 min. Les gels ont ensuite été visualisés sous lumière UV à l'aide du système Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad), et les images analysées avec le logiciel Image Lab™.

3.2.8 Profil de fermentation des hydrates de carbone

L'aptitude des souches retenues à fermenter divers glucides a été évaluée à l'aide des galeries miniaturisées API 50 CH (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), en utilisant le milieu spécifique API 50 CHL, conformément au protocole recommandé par le fournisseur. Cette méthode permet de déterminer le profil métabolique glucidique de chaque souche.

3.2.8.1 Mode opératoire

3.2.8.1.1 Préparation des galeries

Les galeries API 50 CH sont constituées de 5 bandes comportant chacune 10 cupules numérotées. Avant inoculation :

- Le code de la souche a été inscrit sur la languette latérale de la boîte d'incubation.
- Environ 10 mL d'eau distillée stérile ont été ajoutés au fond de la boîte pour maintenir une atmosphère humide.
- Les bandes ont été stérilement disposées dans les alvéoles prévues.

3.2.8.1.2 Préparation de l'inoculum

Les souches lactiques ont été cultivées sur gélose MRS et incubées à 37 °C en anaérobiose pendant 24 heures. Leur pureté a été confirmée par examen macro et microscopique après coloration de Gram. Une suspension a été préparée dans le milieu API 50 CHL, ajustée à une turbidité équivalente à 2 McFarland.

3.2.8.1.3 Inoculation des galeries

La suspension a été répartie dans les cupules à l'aide d'une micropipette, en évitant la formation de bulles. Les cupules ont ensuite été recouvertes d'huile de vaseline stérile pour maintenir l'anaérobiose. Les galeries ont été incubées à 37 °C. La lecture des résultats a été effectuée après 24 et 48 heures.

Les résultats ont été interprétés selon les critères suivants :

- Positif (+) : changement de couleur vers le jaune ou le noir (tube 25).
- Négatif (-) : couleur violette conservée.
- Douteux (V) : teinte intermédiaire.

3.2.9 Etude statistique

Toutes les expériences ont été réalisées en double, et les résultats exprimés en moyennes $\pm$ écart-type.

- Pour le criblage de l'activité antibactérienne, les différences ont été analysées par ANOVA à deux facteurs (Two-way ANOVA).
- Pour les tests d'hydrophobicité et d'auto-agrégation, une ANOVA à un facteur (One-way ANOVA) a été utilisée.

Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics version 20, avec un seuil de signification fixé à $p \leq 0,05$.

CHAPITRE 4

4 RESULTATS ET DISCUSSION

4.1 Isolement et identification phénotypique des bactéries lactiques

Un total de 172 bactéries ont été isolées et purifiées à partir de lait cru provenant des animaux étudiés, à savoir la chamelle, la vache, la chèvre et la brebis. Les milieux sélectifs utilisés pour l'isolement étaient le MRS, adapté aux *Lactobacillus* spp., et le M17, plus favorable à la croissance des *Lactococcus* spp. La répartition des isolats est la suivante : 88 isolats issus du lait de chamelle, 59 du lait de vache, 19 du lait de chèvre et 6 du lait de brebis. Chaque isolat a été codifié selon l'espèce animale, la région de collecte et le milieu d'isolement utilisé.

Ces isolats ont ensuite fait l'objet d'une caractérisation phénotypique.

- Macroscopiquement, les colonies observées sur MRS et M17 étaient généralement de forme lenticulaire, de couleur blanchâtre à crème, aux contours réguliers et à surface lisse, avec un diamètre variant entre 1 et 4 mm (Figure 4.1).
- Microscopiquement, les cellules observées étaient Gram-positives, avec des formes cocciques, bacillaires ou coccobacillaires, et un agencement variable : isolées, en paires ou en courtes chaînes. Aucune formation de spores n'a été observée (Figure 4.1).
- Biochimiquement, sur les 172 isolats obtenus, 69 ont été écartés en raison d'un profil catalase positif, incompatible avec les propriétés typiques des bactéries lactiques (voir Tableau 4.1). Les 103 isolats restants, présélectionnés pour la suite des analyses, se sont tous révélés négatifs aux tests de catalase et d'oxydase, ce qui soutient leur appartenance aux bactéries lactiques.

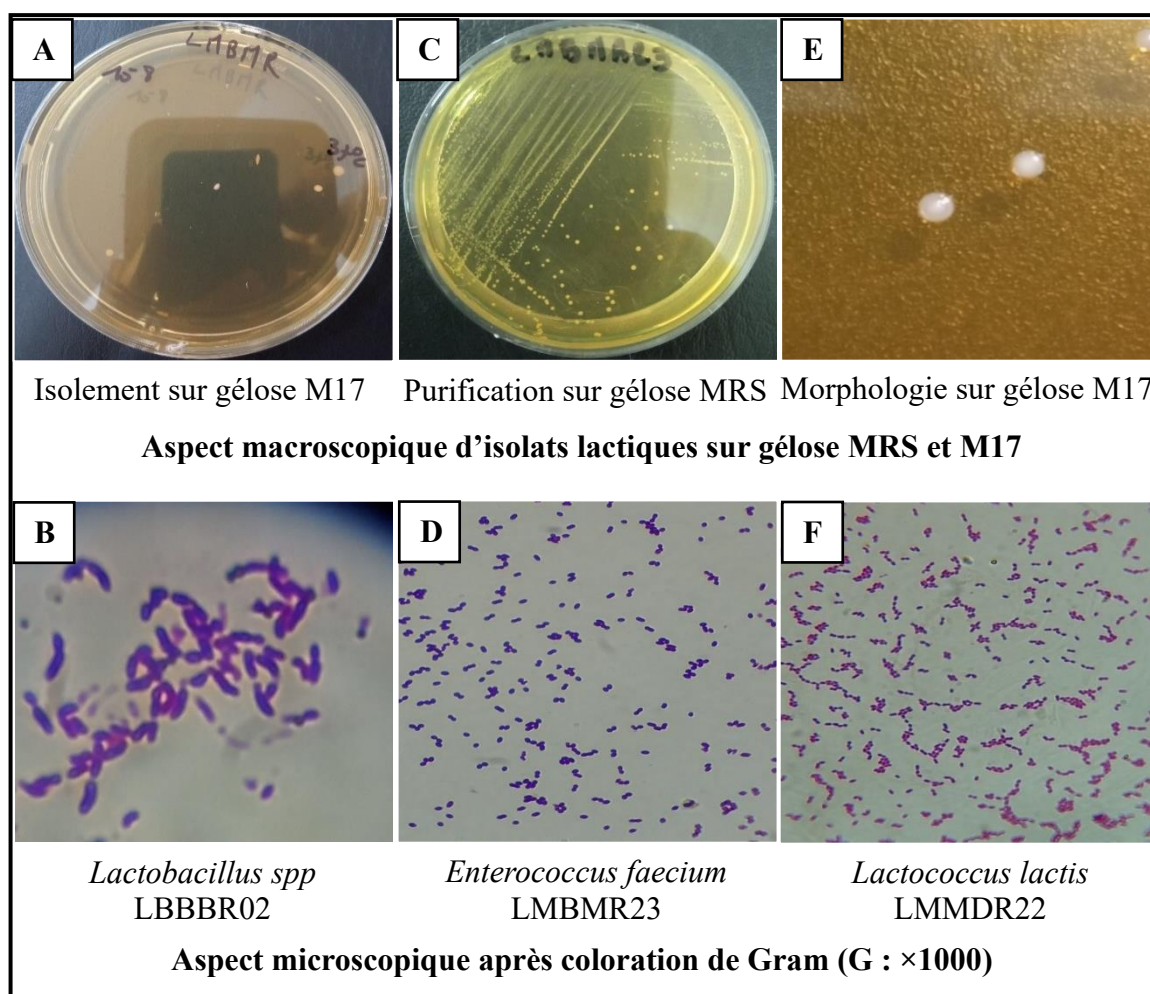


Figure 4.1 : Morphologie d'isolat lactique sur gélose MRS/M17 (A, C, E) et observations microscopiques après coloration de Gram (B, D, F) des souches de *Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis* et *Enterococcus faecium* isolées à partir de lait cru. A : Colonies bactériennes observées sur gélose M17 lors de l'isolement initial ; C : Colonies de la souche *Enterococcus faecium* LMBMR23 après purification ; E : Morphologie des colonies d'un isolat lactique sur gélose M17 ; B, D et F : Observation en microscopie optique, après coloration de Gram, des souches *Lactobacillus* spp. LBBBR02, *Enterococcus faecium* LMBMR23 et *Lactococcus lactis* LMMDR22, respectivement.

Bien que les isolats obtenus sur les milieux MRS et M17 présentent des caractéristiques macroscopiques similaires, des différences notables ont été observées au niveau microscopique :

- Sur milieu MRS, les cocci et coccobacilles isolés à 37 °C et 44 °C, en aérobiose ou anaérobiose, étaient généralement regroupés en paires ou en chaînes courtes, tandis que les bacilles apparaissaient isolés ou en chaînes.

- Sur milieu M17, tous les isolats étaient de forme cocciq. Ceux incubés à 37 °C formaient des paires ou chaînes courtes, alors que la majorité des isolats à 44 °C formaient des chaînes plus longues.

Selon la littérature [2, 19, 24-30, 33, 37], les formes bacillaires isolées sur MRS pourraient correspondre au genre *Lactobacillus*, tandis que les cocci en longues chaînes observés sur M17 à 44 °C pourraient appartenir au genre *Streptococcus*. Les autres formes cocciq. et coccobacillaires observées en paires ou courtes chaînes sont susceptibles d'appartenir aux genres *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* ou *Leuconostoc*, sous réserve de confirmations par des analyses complémentaires.

Il convient de souligner que cette étude n'avait pas pour objectif d'isoler un genre spécifique de bactéries lactiques (BL), visait plutôt à constituer une collection représentative des bactéries lactiques présentes dans le lait cru d'animaux d'élevage. La majorité des isolats présélectionnés présentaient une morphologie cocciq. ou coccobacillaire.

Le lait cru, riche en nutriments, constitue un milieu favorable au développement de nombreux micro-organismes, notamment les bactéries lactiques. Les genres les plus fréquemment retrouvés dans ce substrat sont *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Streptococcus* [179-181]. Les caractères morphologiques observés dans cette étude sont en accord avec les descriptions disponibles dans la littérature pour ces genres, ce qui est confirmé par plusieurs travaux portant sur la microflore du lait et des produits laitiers [139, 155, 182].

En ce qui concerne leur prévalence dans le lait cru, il n'existe pas de consensus clair quant à la dominance d'un genre bactérien sur un autre. Par exemple, Franciosi et al. [183] ont rapporté une prédominance des genres *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus* dans le lait cru de vache, tandis que *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* étaient moins abondants. En revanche, Idbeis [184] a observé une dominance du genre *Lactobacillus*, suivi de *Lactococcus*, sans détection des autres genres dans une étude similaire.

Tableau 4.1 : Répartition et caractéristiques phénotypiques des isolats microbiens issus de laits crus d'animaux d'élevage.

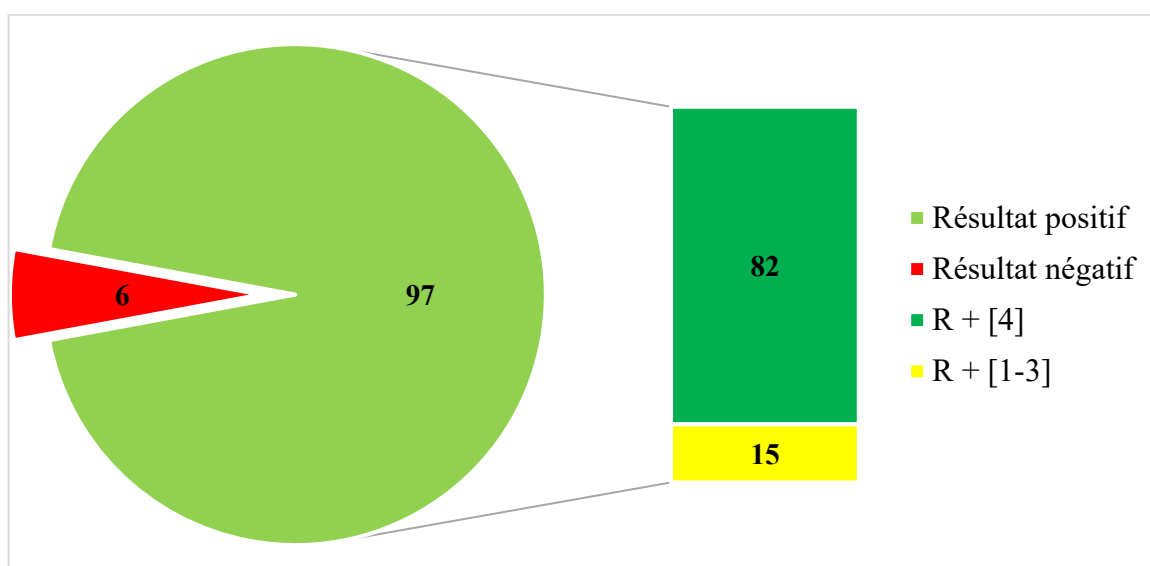
Origine de lait	Codification		Nombre d'isolats	Morphologie						Tests préliminaires	
				Aspect Macroscopique			Aspect Microscopique				
	MRS	M17		Forme	Couleur	Taille (mm)	Gram	Forme	Arrangement	Catalase	Oxydase
Chamelle	LMMDR	LMMDM	33	Lenticulaire avec contour régulier	Blanche	1-4	+	Bacille Cocci Coccobacille	En Chaîne En Deux Seul	-	-
			12	Lenticulaire avec contour variables	Blanche	Variable	+	Bacille Cocci	En Chaîne En Amas	+	-/+
	LMBMR	LMBMM	30	Lenticulaire avec contour régulier	Blanche	1-4	+	Bacille Cocci Coccobacille	En Chaîne En Deux Seul	-	-
			13	Lenticulaire avec contour irrégulier	Blanche	>4	+	Bacille	En Chaîne Seul	+	+
Vache	LVBBR	LVBBM	35	Lenticulaire avec contour régulier	Blanche	1-4	+	Bacille Cocci Coccobacille	En Chaîne En Deux Seul	-	-
			07	Lenticulaire avec contour régulier	Blanche	1-2	+	Cocci	En Amas	+	-
	LVCBR	LVCBM	17	Lenticulaire avec contour variable	Blanche Jaune	Variable	+	Bacille Cocci	En Chaîne En Amas	+	+/-
Chèvre	LCBBR	LCBBM	01	Lenticulaire avec contour régulier	Blanche	≈ 2	+	Coccobacille	En Deux	-	-
			18	Lenticulaire avec contour régulier	Blanche	1-2	+	Cocci	En Amas	+	-
Brebis	LBBBR	LBIBM	04	Lenticulaire avec contour régulier	Blanche	3-4	+	Bacille	En Chaîne	-	-
			02	Lenticulaire avec contour irrégulier	Jaune	>4	+	Bacille	En Chaîne Seul	+	+

LMMD (R/M) : Lait caMelin, Al-Mosran, Djelfa (MRS/M17) ; LMBM (R/M) : Lait caMelin, Boughezoul, Médéa (MRS/M17) ; LVBB (R/M) : Lait de Vache, Ben Saleh, Blida (MRS/M17) ; LVCB (R/M) : Lait de Vache, Chaiba, Berbissa (MRS/M17) ; LCBB (R/M) : Lait de Chèvre, Ben Saleh, Blida (MRS/M17) ; LBBB (R/M) : Lait de Brebis, Ben Saleh, Blida (MRS/M17).

4.2 Criblage antibactérien des souches lactiques

Les 103 isolats présumés appartenir aux bactéries lactiques ont été testés en double à l'égard de quatre souches indicatrices : *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739 et *Salmonella enterica ssp enterica* sérotype Abony NCTC 6017. Les diamètres des zones d'inhibition ont été exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Parmi ces isolats, six n'ont montré aucune activité antibactérienne significative (zone d'inhibition ≤ 2 mm) contre les quatre pathogènes. En revanche, 97 isolats ont exercé un effet antagoniste (zone d'inhibition > 2 mm) vis-à-vis d'au moins une souche indicatrice. Parmi ces derniers, 82 isolats ont présenté une activité antibactérienne contre toutes les souches testées, tandis que 15 isolats ont montré une activité antibactérienne limitée, n'inhibant que trois pathogènes au maximum (Figure 4.2).



- Résultat positif : diamètre de la zone d'inhibition > 2 mm vis-à-vis au moins une souche indicatrice.
- Résultat négatif : diamètre de la zone d'inhibition ≤ 2 mm.
- R + [4] : inhibition des quatre souches indicatrices.
- R + [1-3] : inhibition d'un à trois pathogènes.

Figure 4.2 : Distribution des isolats lactiques selon leurs capacités à inhiber des souches indicatrices.

Le criblage des isolats lactiques s'est basé, en premier temps, sur la capacité d'inhibition de l'ensemble des pathogènes testés, puis sur l'intensité de cette activité. Ainsi, les 82 isolats actifs contre toutes les souches indicatrices ont été retenus pour une analyse statistique approfondie. Les diamètres des zones d'inhibition variaient significativement d'un isolat à

l'autre, ainsi qu'entre les différentes souches indicatrices. La plus petite zone d'inhibition observée était de $8,25 \pm 0,35$ mm (incluant le diamètre du spot ≈ 6 mm) pour l'isolat LCBBR04 contre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. À l'inverse, l'isolat LMMDR16 a présenté la plus grande zone d'inhibition, atteignant $27,5 \pm 0,71$ mm, contre *Salmonella enterica ssp enterica* sérotype Abony NCTC 6017 (voir Appendice E).

- Sélection statistique :

Compte tenu de la présence de deux facteurs fixes (isolat lactique et souche indicatrice) et d'une variable dépendante (diamètre des zones d'inhibition), une analyse de variance à deux facteurs (Two-way ANOVA) a été réalisée avec un seuil de signification $\alpha = 0,05$. Le test post hoc de Tukey a été utilisé pour comparer les moyennes des zones d'inhibition entre isolats, permettant d'identifier ceux présentant des différences significatives. Ce test compare la moyenne globale des souches indicatrices à la moyenne individuelle pour chaque isolat lactique, facilitant leur classification selon leur performance antibactérienne. En comparant les moyennes des isolats lactiques vis-à-vis de l'ensemble des souches indicatrices, la valeur minimale observée était de $12,25 \pm 3,28$ mm pour l'isolat LMMDR14, tandis que la valeur maximale a été enregistrée pour l'isolat LMMDR27 avec une moyenne de $19,75 \pm 5,79$ mm. Les résultats ont été ordonnés par ordre décroissant. Les critères de sélection des isolats les plus performants ont reposé sur les plus grandes valeurs moyennes, en retenant au moins deux isolats par type de lait. Ainsi, douze isolats présentant des moyennes des zones d'inhibition comprises entre $19,75 \pm 5,79$ mm (LMMDR27) et $17,56 \pm 4,59$ mm (LVBBR13) ont été retenus (voir Tableau 4.2 et Figure 4.3).

Tableau 4.2 : Diamètres des zones d'inhibition des 12 isolats lactiques retenus.

Isolats lactiques	Diamètres des zones d'inhibition (mm)				
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>S. enterica</i> serotype abony NCTC 6017	Moyenne
LMMDR27	12,25 ± 0,35	17,25 ± 1,06	25,5 ± 2,12	24 ± 1,41	19,75 ± 5,79
LMMDR16	11,25 ± 0,35	14 ± 0,00	23 ± 1,41	27,5 ± 0,71	18,94 ± 7,06
LMMDR33	12,5 ± 0,00	18,5 ± 0,71	22,75 ± 0,35	21 ± 0,00	18,69 ± 4,16
LMMDR06	12,25 ± 0,35	15,5 ± 0,71	20,25 ± 1,06	26,5 ± 2,12	18,63 ± 5,81
LMMDR22	9,75 ± 0,35	20,5 ± 3,54	25 ± 1,41	19 ± 1,41	18,56 ± 6,13
LMMDR26	11,75 ± 0,35	14,5 ± 0,71	24,5 ± 2,12	23 ± 1,41	18,44 ± 5,89
LMMDR05	11 ± 0,00	23,5 ± 2,12	18,5 ± 3,54	19 ± 1,41	18,00 ± 5,07
LMBMR28	14,75 ± 0,35	18,25 ± 1,06	18,5 ± 0,71	19,5 ± 0,71	17,75 ± 2,00
LMBMR23	18 ± 1,41	17,5 ± 0,71	15,75 ± 0,35	19,25 ± 0,35	17,63 ± 1,48
LVBBR25	12,25 ± 0,35	22 ± 1,41	21 ± 1,41	15 ± 1,41	17,56 ± 4,45
LMMDR23	11,75 ± 1,06	21 ± 4,24	22 ± 2,83	15,5 ± 2,12	17,56 ± 4,94
LVBBR13	11,25 ± 0,35	22 ± 0,00	21 ± 0,00	16 ± 0,00	17,56 ± 4,59

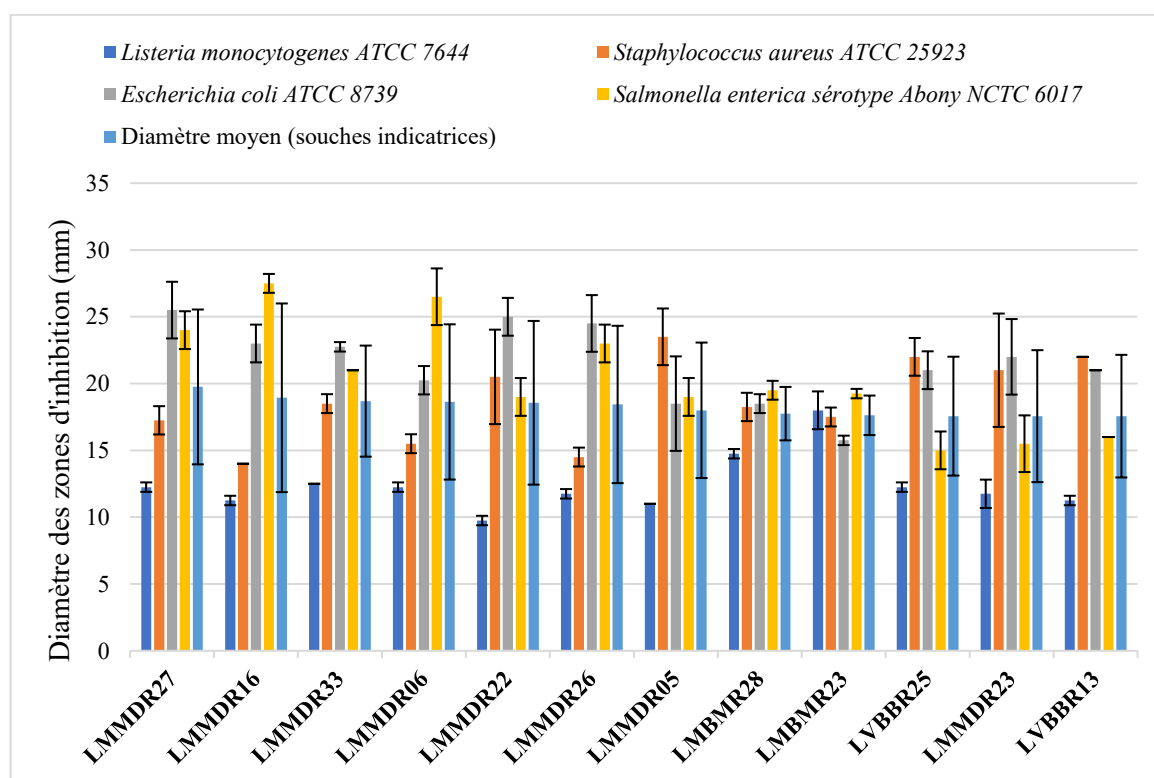


Figure 4.3 : Diamètres moyens des zones d'inhibition formées par les 12 isolats lactiques sélectionnés contre quatre souches pathogènes de référence.

La capacité des bactéries lactiques à inhiber la prolifération de micro-organismes indésirables constitue un critère essentiel dans la sélection de probiotiques. Ces bactéries jouent un rôle important dans la prévention, dans certains cas, le traitement des toxoinfections alimentaires d'origine bactérienne. Dans la présente étude, plusieurs isolats présentant une forte activité antibactérienne à large spectre ont été présélectionnés. Bien que leur identification moléculaire n'ait pas encore été réalisée à ce stade, leur profil morphologique et biochimique suggèrent une appartenance probable aux genres *Lactococcus* et *Enterococcus*. L'activité antibactérienne des genres *Lactococcus* et *Enterococcus* est bien documentée dans la littérature [157, 185, 186]. Akbar et al. [187] ont démontré le potentiel antibactérien de souches de *Lactococcus* vis-à-vis des mêmes souches pathogènes utilisées dans notre étude. De même, Han et al. [188] ont rapporté un effet antagoniste d'isolats appartenant au genre *Enterococcus* envers ces pathogènes. L'effet inhibiteur exercé par les bactéries lactiques est généralement attribué à la production de métabolites antimicrobiens tels que les acides organiques (notamment l'acide lactique et l'acide acétique), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et, potentiellement, les bactériocines [189]. Dans la littérature, les souches présentant des zones d'inhibition importantes sont souvent décrites comme productrices de bactériocines, peptides antimicrobiens d'origine ribosomale.

Dans notre étude, bien que la production de bactériocines n'ait pas été directement confirmée, il est possible que ces composés aient contribué à l'activité observée. Ces substances sont également à l'étude, dans un contexte médical, comme alternatives potentielles aux antibiotiques, notamment face à l'émergence de souches bactériennes multirésistantes [190].

4.3 Identification protéomique des isolats lactiques sélectionnés

L'identification protéomique par spectrométrie de masse MALDI-TOF MS a permis d'assigner les isolats sélectionnés à deux genres distincts : *Lactococcus* et *Enterococcus*. La répartition était équivalente, avec six isolats (50 %) attribués au genre *Lactococcus*, identifiés comme *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, et six (50 %) au genre *Enterococcus*, identifiés comme *Enterococcus faecium* (Tableau 4.3).

Tableau 4.3 : Identification protéomique des isolats sélectionnés.

Isolat	Organisme	Valeur de score
LMMDR27	<i>Enterococcus faecium</i>	1,85
LMMDR16	<i>Enterococcus faecium</i>	2,066
LMMDR33	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	2,113
LMMDR06	<i>Lactococcus lactis</i>	1,869
LMMDR22	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	2,307
LMMDR26	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	2,274
LMMDR05	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	2,203
LMBMR28	<i>Enterococcus faecium</i>	2,27
LMBMR23	<i>Enterococcus faecium</i>	2,221
LVBBR25	<i>Enterococcus faecium</i>	2,159
LMMDR23	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	2,289
LVBBR13	<i>Enterococcus faecium</i>	2,157

Les spectres protéomiques générés, représentant le profil de masse de chaque isolat (voir Appendice F), ont été comparés à ceux contenus dans la base de données fournie par le fabricant. La similarité a été exprimée par des valeurs de score.

Toutes les valeurs obtenues étaient supérieures à 1,700, indiquant une identification fiable au niveau du genre. La majorité des isolats (10 sur 12, soit 83,33 %) ont présenté un score supérieur à 2, correspondant à une identification très probable au niveau de l'espèce. Deux isolats, *Enterococcus faecium* LMMDR27 et *Lactococcus lactis* LMMDR06, ont obtenu des scores légèrement inférieurs (1,85 et 1,869 respectivement), ce qui suggère une identification probable mais nécessitant confirmation. Afin d'évaluer la similarité entre les isolats appartenant à une même espèce, un dendrogramme a été généré (Figure 4.4). Les isolats identifiés comme *Enterococcus faecium* y sont représentés en bleu, tandis que ceux correspondant à *Lactococcus lactis ssp lactis* apparaissent en rouge.

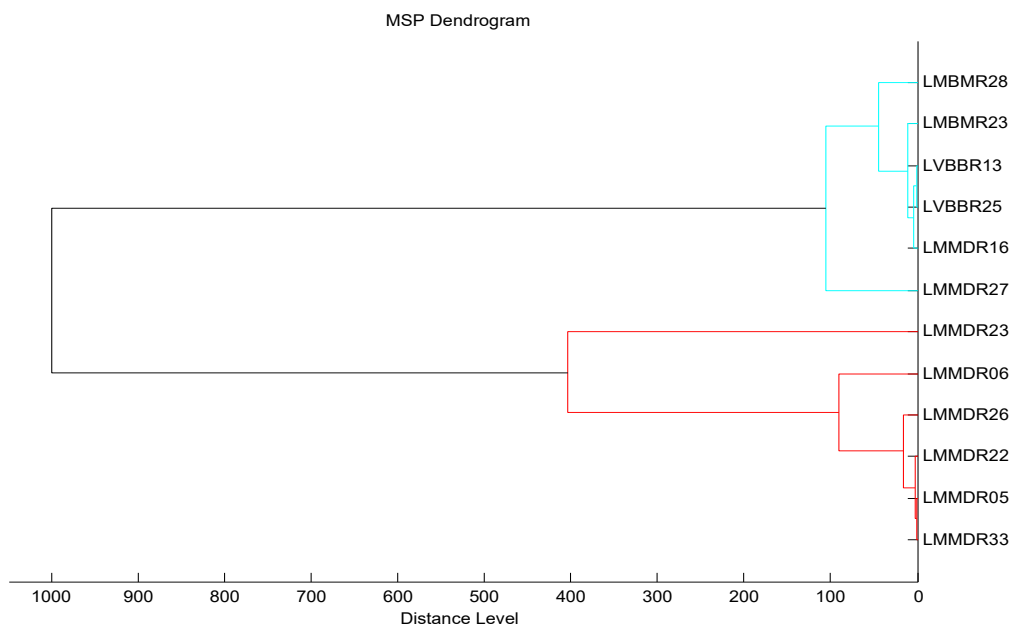


Figure 4.4 : Dendrogramme généré par MALDI-TOF MS pour les souches d'*Enterococcus faecium* (blue) et *Lactococcus lactis ssp lactis* (rouge).

Le lait cru constitue un réservoir naturel riche en bactéries lactiques, dont la diversité peut être significative. La caractérisation exhaustive de cette biodiversité nécessite des approches avancées, telles que la métagénomique. L'identification phénotypique des micro-organismes reste limitée en précision, tandis que les approches moléculaires ou protéomiques demeurent les plus performantes pour une analyse qualitative et quantitative.

La présence prédominante des espèces *Lactococcus lactis ssp. lactis* et *Enterococcus faecium* dans le lait cru est largement rapportée dans la littérature [185, 191]. Par exemple, Kadri et al. [192] ont montré que dans le lait camelin marocain, le phylum *Firmicutes* était dominé par ces deux espèces, appartenant respectivement aux familles *Streptococcaceae* et *Enterococcaceae*.

Ces espèces sont largement étudiées pour leurs applications probiotiques et/ou technologiques. Sonei et al. [169] ont évalué le potentiel de quinze souches d'*Enterococcus*, parmi lesquelles quatre ont présenté des caractéristiques technologiques intéressantes et un bon profil probiotique. Par ailleurs, une autre étude menée sur quatorze souches de *Lactococcus* isolées à partir de lait cru et de grains de kéfir a montré que les souches issues du lait cru possédaient un fort potentiel technologique, tandis que celles issues du kéfir présentaient un pouvoir probiotique élevé [193]. Selon la littérature, ces deux espèces pourraient ainsi être valorisées dans des applications probiotiques et/ou technologiques.

4.4 Aspect sécuritaire des souches lactiques sélectionnées

Avant toute valorisation à des fins probiotiques et/ou technologiques, il est indispensable d'évaluer l'innocuité des souches lactiques sélectionnées. Certaines bactéries lactiques peuvent en effet porter des gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques, avec un risque potentiel de transfert horizontal vers des bactéries pathogènes au sein du tractus gastro-intestinal [194].

4.4.1 Sensibilité aux antibiotiques :

Le profil de sensibilité des souches testées aux différentes classes d'antibiotiques variait entre les genres *Lactococcus* et *Enterococcus*, et même entre les souches appartenant à une même espèce (*Lactococcus lactis ssp lactis* ou *Enterococcus faecium*) (Figure 4.5, Tableaux 4.4 et 4.5).

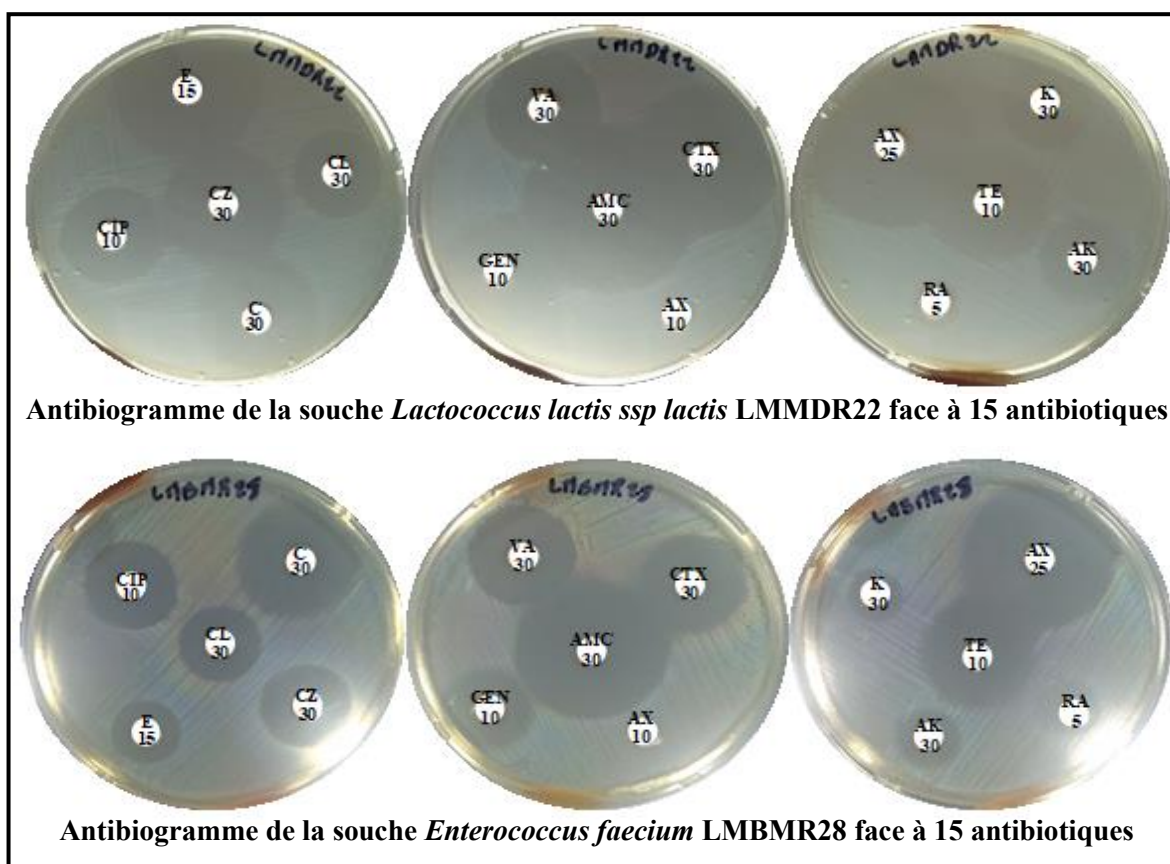


Figure 4.5 : Profils d'antibiogramme des souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* LMMDR22 et *Enterococcus faecium* LMBMR28. CIP 10 : Ciprofloxacine 10 µg ; CL 30 : Céfalexine 30 µg ; CZ 30 : Céfazoline 30 µg ; C 30 : Chloramphenicol 30 µg ; E15 : Erythromycine 15 µg ; AX (10 et 25) : Amoxycilline (10 et 25 µg) ; AMC 30 : Amoxycilline + Acide clavulanique 20+10 µg ; GEN 10 : Gentamicine 10 µg ; AK 30 : Amikacine 30 µg ; K 30 : Kanamycine 30 µg ; CTX 30 : Céfotaxime 30 µg ; VA 30 : Vancomycine 30 µg ; RA 5 : Rifampicine 5 µg ; TE 10 : Tétracycline 10 µg.

- *Lactococcus lactis ssp. lactis* :

Toutes les souches testées étaient sensibles à la vancomycine, gentamicine, amoxicilline 25 µg, amoxicilline/acide clavulanique, céfotaxime, érythromycine, chloramphénicol, céfazoline, kanamycine et tétracycline. En revanche, elles étaient toutes résistantes à l'amoxicilline 10 µg et à la rifampicine. Concernant la ciprofloxacine, cinq souches (83,33 %) étaient sensibles, tandis que la souche LMMDR05 (16,66 %) présentait une résistance intermédiaire. Pour la céfalexine, cinq souches (83,33 %) étaient sensibles et une souche (LMMDR06, 16,66 %) présentait une résistance intermédiaire. En ce qui concerne l'amikacine, quatre souches (66,66 %) étaient sensibles, tandis que les deux souches (LMMDR06 et LMMDR26, soit 33,33 %) présentaient une résistance intermédiaire.

Tableau 4.4 : Profil de sensibilité des souches de *Lactococcus lactis* aux antibiotiques testés.

Antibiotique	LMMDR 33	LMMDR 06	LMMDR 22	LMMDR 26	LMMDR 05	LMMDR 23
Vancomycine 30 µg	30,63±0,53 (S)	26,88±0,53 (S)	26,25±0,71 (S)	25±0,00 (S)	29±0,00 (S)	25,13±0,18 (S)
Gentamycine 10 µg	31,5±0,71 (S)	28,13±0,53 (S)	26,75±0,71 (S)	25,13±0,18 (S)	28,88±0,18 (S)	27,25±0,35 (S)
Amoxycilline 10 µg	6±0,00 (R)	6±0,00 (R)	6±0,00 (R)	6±0,00 (R)	6±0,00 (R)	6±0,00 (R)
Amoxycilline 25 µg	44,75±0,35 (S)	37,38±0,53 (S)	38±0,00 (S)	35,25±0,35 (S)	43,5±0,71 (S)	37,38±0,18 (S)
Amoxycilline + Acide clavulanique 30 µg	44,25±1,06 (S)	39,75±0,35 (S)	39,38±0,88 (S)	39±0,71 (S)	44,88±0,18 (S)	39,75±0,35 (S)
Céfotaxime 30 µg	38,5±0,71 (S)	34,63±0,53 (S)	33,88±0,53 (S)	34,25±0,35 (S)	37±1,41 (S)	29,13±7,25 (S)
Erythromycine 15 µg	40,25±0,35 (S)	32,88±0,53 (S)	32±0,00 (S)	31,5±0,71 (S)	37,38±0,18 (S)	34,38±0,18 (S)
Ciprofloxacine 10 µg	25,5±0,71 (S)	21,88±0,18 (S)	22,38±0,18 (S)	21,5±0,71 (S)	19,88±0,18 (I)	25,19±0,53 (S)
Chloramphenicol 30 µg	34,5±0,71 (S)	28,13±0,53 (S)	28,75±0,35 (S)	27,38±1,24 (S)	31,25±0,35 (S)	28,13±0,18 (S)
Céfazoline 30 µg	32,25±1,06 (S)	26,63±0,18 (S)	27±0,71 (S)	26,5±1,41 (S)	29,63±0,53 (S)	29,75±0,35 (S)
Céfalexine 30 µg	21,75±0,35 (S)	20,13±0,18 (I)	21±0,35 (S)	21,13±0,18 (S)	21,25±0,35 (S)	23,13±0,53 (S)
Rifampicine 5 µg	12,75±0,35 (R)	10,13±0,18 (R)	10,38±0,18 (R)	10,38±0,18 (R)	11,5±0,00 (R)	11,63±0,18 (R)
Amikacine 30 µg	25,75±0,35 (S)	19,5±0,71 (I)	21±0,00 (S)	19,25±0,35 (I)	23,5±0,71 (S)	22,75±0,35 (S)
Kanamycine 30 µg	28±1,41 (S)	21,38±0,53 (S)	21,5±0,71 (S)	21±0,00 (S)	26±1,77 (S)	23,5±0,35 (S)
Tétracycline 10 µg	31,5±0,71 (S)	26,25±0,35 (S)	27,13±0,88 (S)	27,75±0,35 (S)	31,13±0,18 (S)	25,63±0,53 (S)

R : Résistante ; I : Intermédiaire ; S : Sensible. Normes des diamètres des zones d'inhibition pour *Lactococcus lactis ssp. lactis* (selon Jawan et al [158]) : Tous les antibiotiques testés, S $\geq$ 21, I = 16-20, R $\leq$ 15.

Selon les seuils de sensibilité publiés par Jawan et al [166], ces résultats suggèrent que les souches de *Lactococcus lactis ssp. lactis* étudiées peuvent être considérées comme sûres. La résistance observée à l'amoxicilline à faible concentration (10 µg) est contournée par la sensibilité des souches à une concentration plus élevée d'amoxicilline (25 µg), ainsi qu'à l'association amoxicilline/acide clavulanique testée à 30 µg. La résistance à la rifampicine chez *Lactococcus lactis* a été rapportée par Jawan et al [166], dans une étude portant sur le potentiel probiotique de la souche *Lactococcus lactis* Gh1 et ses substances inhibitrices de type bactériocine destinées à un usage agroalimentaire. Cette observation a été confirmée par Plumed-Ferrer et al [195], qui ont évalué la sensibilité aux antimicrobiens de souches de *Lactococcus lactis ssp. lactis* et *Lactococcus garvieae* isolées d'infections intra-mammaires bovines. Ils ont observé une résistance à la rifampicine chez 44 des 46 souches testées.

- *Enterococcus faecium* :

Les souches d'*Enterococcus faecium* étaient toutes sensibles (100 %) à la vancomycine, gentamicine, amoxicilline 25 µg, amoxicilline/acide clavulanique, céfotaxime, chloramphénicol et tétracycline, ce qui constitue un profil favorable pour leur valorisation probiotique et/ou technologique [196].

En revanche, des résistances intermédiaires ont été observées pour plusieurs autres antibiotiques. Concernant l'érythromycine, cinq souches sur six (83,33 %) présentaient une résistance intermédiaire, tandis qu'une seule (LVBBR13 ; 16,67 %) était sensible. Pour la ciprofloxacine, trois souches (50 %) étaient sensibles (LMMDR27, LMMDR16, LVBBR13), et trois autres (50 %) résistantes intermédiaires (LMBMR28, LMBMR23, LVBBR25). En ce qui concerne la céfazoline, trois souches (50 %) étaient sensibles (LMBMR28, LMBMR23, LVBBR25), deux (33,33 %) résistantes (LMMDR27, LMMDR16), et une (LVBBR13) résistante intermédiaire. Pour la céfalexine, trois souches (50 %) étaient résistantes, et trois autres résistantes intermédiaires. Enfin, pour l'amikacine, une seule souche (16,67 %) était résistante (LMBMR23), les cinq autres (83,33 %) présentant une résistance intermédiaire (voir Tableau 4.5).

Ces résultats sont en accord avec les données rapportées dans la littérature. Xiao et al. [197] ont observé une résistance à la rifampicine chez la souche *Enterococcus faecium* B13, tandis que Pereira et al. [198] ont noté une sensibilité à cet antibiotique chez des isolats de *Lactococcus* et *Enterococcus* provenant d'environnements aquatiques. Kim et al. [199] ont rapporté des taux élevés de résistance à l'érythromycine (55,4 %) et à la ciprofloxacine

(43,8 %) dans des souches d'*Enterococcus faecium* isolées de viande de poulet vendue en Corée. De plus, Valledor et al. [200] ont observé une résistance à l'érythromycine chez deux souches d'*Enterococcus* sélectionnées pour des applications probiotiques.

Tableau 4.5 : Profil de sensibilité des souches d'*Enterococcus faecium* aux antibiotiques testés.

Antibiotique	LMMDR 27	LMMDR 16	LMBMR 28	LMBMR 23	LVBRR 25	LVBRR 13
Vancomycine 30 µg	24±0,00 (S)	25,13±0,18 (S)	24±0,00 (S)	22,38±0,53 (S)	24,25±0,35 (S)	26±0,00 (S)
Gentamycine 10 µg	20,25±0,00 (S)	21,5±0,00 (S)	19,13±0,18 (S)	19±0,00 (S)	20,88±0,18 (S)	23,5±0,71 (S)
Amoxycilline 10 µg	6±0,00 (R)	6±0,00 (R)	6±0,00 (R)	6±0,00 (R)	6±0,00 (R)	6±0,00 (R)
Amoxycilline 25 µg	32±0,00 (S)	33,25±0,35 (S)	32,38±0,18 (S)	30,63±0,88 (S)	35,38±0,18 (S)	36,63±0,53 (S)
Amoxycilline + Acide clavulanique 30 µg	34,75±0,35 (S)	36,38±0,18 (S)	34,5±0,71 (S)	32,25±0,35 (S)	33,88±0,53 (S)	39,25±0,35 (S)
Céfotaxime 30 µg	22,75±0,35 (S)	22,75±0,5 (S)	22,25±0,35 (S)	22,25±0,35 (S)	21,88±0,18 (S)	24,88±0,88 (S)
Erythromycine 15 µg	20±0,00 (I)	20±0,35 (I)	16,75±0,35 (I)	16±0,00 (I)	18,63±0,18 (I)	25,13±0,18 (S)
Ciprofloxacine 10 µg	21,75±0,35 (S)	21,75±0,35 (S)	20,25±0,35 (I)	19,63±0,53 (I)	20,63±0,53 (I)	23,13±0,53 (S)
Chloramphenicol 30 µg	27,75±0,35 (S)	27,75±0,35 (S)	25,88±0,53 (S)	24,38±0,18 (S)	27,88±0,18 (S)	27,88±0,18 (S)
Céfazoline 30 µg	9,75±0,35 (R)	9±0,00 (R)	21,38±0,18 (S)	21,25±0,35 (S)	21,75±0,35 (S)	18,25±0,00 (I)
Céfalexine 30 µg	11±0,00 (R)	11,25±0,35 (R)	18,13±0,18 (I)	18,25±0,35 (I)	19,75±0,35 (I)	13,88±0,18 (R)
Rifampicine 5 µg	12,75±0,35 (R)	12±0,00 (R)	12,5±0,71 (R)	12±0,71 (R)	15,5±0,71 (R)	11,88±0,88 (R)
Amikacine 30 µg	15,13±0,18 (I)	15,25±0,35 (I)	15,13±0,18 (I)	14,5±0,71 (R)	16±0,00 (I)	15,75±0,35 (I)
Kanamycine 30 µg	13,75±0,35 (R)	12,5±0,00 (R)	11,75±1,06 (R)	12,75±0,35 (R)	12±0,35 (R)	12,13±0,53 (R)
Tétracycline 10 µg	26,63±0,35 (S)	26,88±0,18 (S)	25,25±0,35 (S)	22,88±0,18 (S)	25,75±0,35 (S)	25,63±0,18 (S)

R : Résistante ; I : Intermédiaire ; S : Sensible. Normes des diamètres des zones d'inhibition pour *Enterococcus spp* (selon les tableaux publiés par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [165]) : Vancomycine, S ≥ 17, I = 15-16, R ≤ 14; Gentamicine, S ≥ 10, I = 7-9, R = 6; Erythromycine, S ≥ 23, I = 14-22, R ≤ 13; Ciprofloxacine, S ≥ 21, I = 16-20, R ≤ 15; Chloramphénicol, S ≥ 18, I = 13-17, R ≤ 12; Rifampicine, S ≥ 20, I = 17-19, R ≤ 16; Tétracycline, S ≥ 19, I = 15-18, R ≤ 14. Les autres antibiotiques : S ≥ 21, I = 16-20, R ≤ 15.

4.4.2 Activité hémolytique, DNase et Gélatinase

Aucune des souches testées de *Lactococcus lactis ssp lactis* et *Enterococcus faecium* n'a présenté d'activité hémolytique de type β ou α : toutes étaient de type γ (absence d'hémolyse) (Figures 4.6). De plus, aucune activité DNase ou gélatinase n'a été détectée (Figures 4.7, 4.8 et Tableau 4.6).

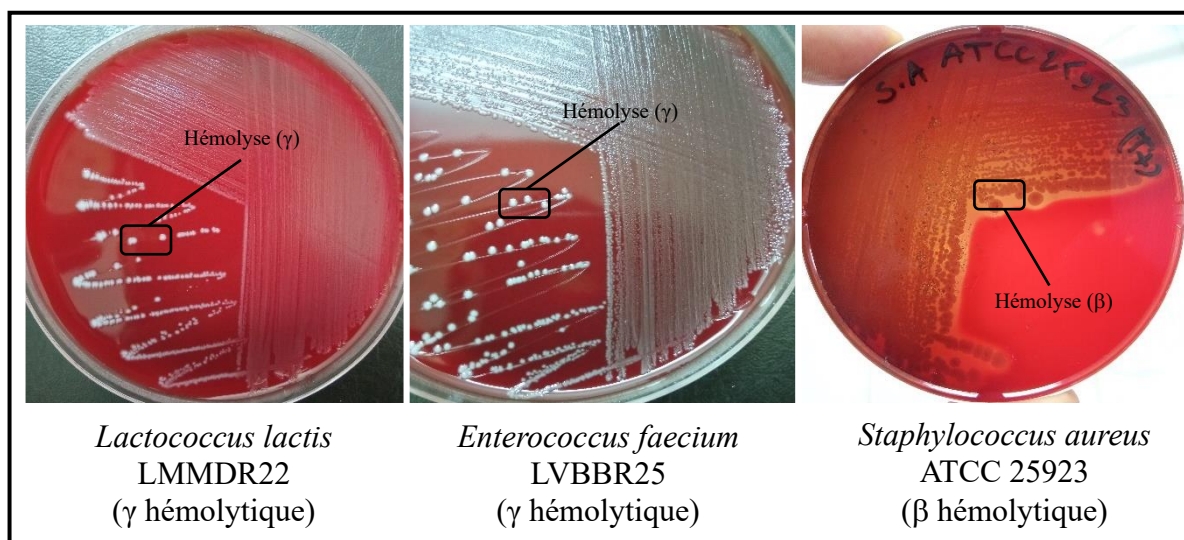


Figure 4.6 : Activité hémolytique des souches *Lactococcus lactis ssp. lactis* LMMDR22, *Enterococcus faecium* LVBBR25 et du témoin positif *Staphylococcus aureus* sur gélose au sang.

Le test d'hémolyse permet d'évaluer la capacité d'une souche bactérienne à dégrader les hématies sur gélose au sang. Cette propriété, lorsqu'elle est présente, est généralement associée à un facteur de virulence. Dans notre étude, toutes les souches testées (*Lactococcus lactis* et *Enterococcus faecium*) ont montré une hémolyse de type γ , c'est-à-dire aucune activité hémolytique, contrairement au témoin positif *Staphylococcus aureus*, qui présente une hémolyse β caractérisée par une zone claire de lyse autour de la colonie.

L'absence d'activité hémolytique chez les souches lactiques testées constitue un indicateur important de leur innocuité pour un usage probiotique ou technologique.

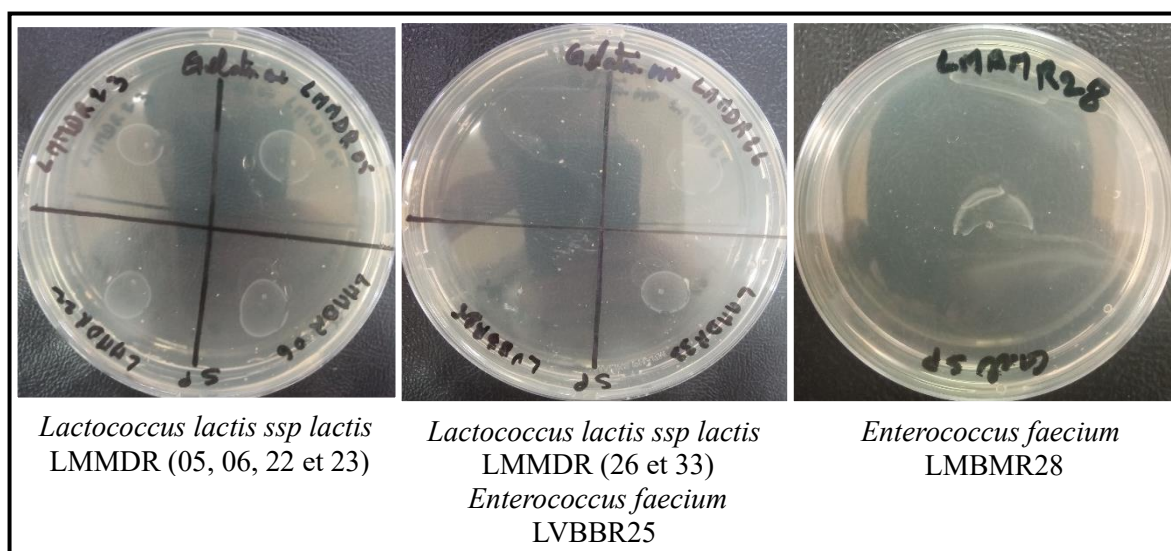


Figure 4.7 : Test de la gélatinase pour certaines souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* et *Enterococcus faecium*.

La gélatinase est une enzyme extracellulaire produite par certaines bactéries pathogènes, capable de dégrader la gélatine, un dérivé du collagène. Sa production est considérée comme un facteur de virulence [198]. Dans notre étude, aucune des souches testées de *Lactococcus lactis ssp lactis* et *Enterococcus faecium* n'a présenté d'activité gélatinase sur le milieu spécifique, indiquant un profil non virulent à ce niveau.

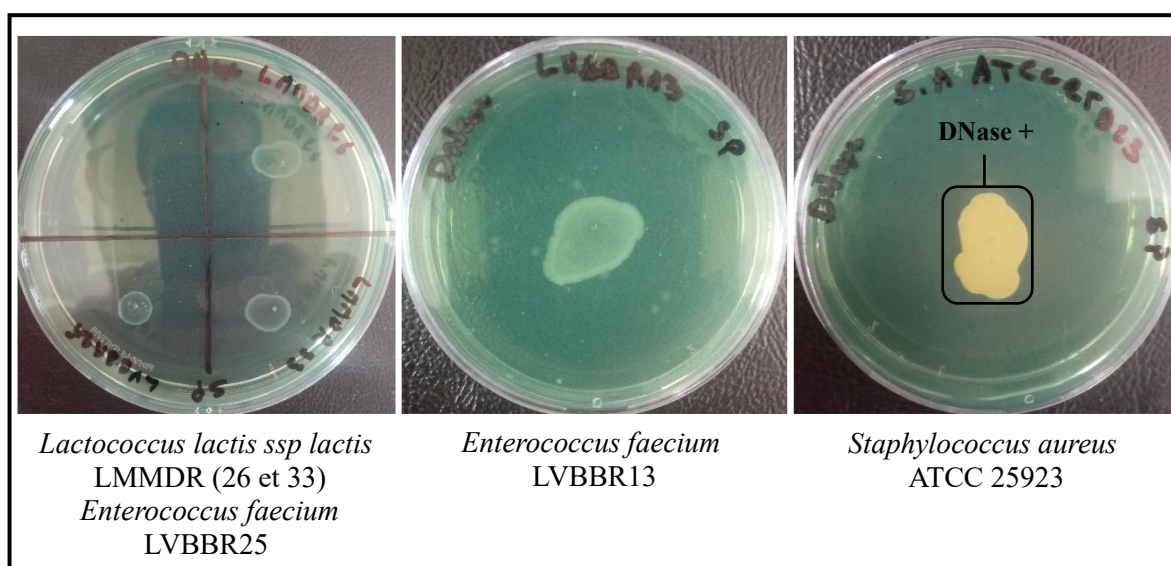


Figure 4.8 : Test de DNase pour certaines souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* et *Enterococcus faecium*.

La DNase est une enzyme qui hydrolyse l'ADN extracellulaire. Sa production par des bactéries peut contribuer à la dégradation des barrières immunitaires de l'hôte et favoriser la dissémination dans les tissus [201]. Aucune activité DNase n'a été détectée chez les souches testées, ce qui constitue un critère favorable en matière de sécurité.

Tableau 4.6 : Profil enzymatique (hémolyse, DNase, gélatinase) des souches sélectionnées de *Lactococcus lactis ssp. lactis* et *Enterococcus faecium*.

Souche lactique	Type d'hémolyse	DNase	Gélatinase
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>			
LMMDR33	γ	-	-
LMMDR06	γ	-	-
LMMDR22	γ	-	-
LMMDR26	γ	-	-
LMMDR05	γ	-	-
LMMDR23	γ	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>			
LMMDR27	γ	-	-
LMMDR16	γ	-	-
LMBMR28	γ	-	-
LMBMR23	γ	-	-
LVBBR25	γ	-	-
LVBBR13	γ	-	-

Les résultats négatifs obtenus aux tests d'hémolyse, DNase et gélatinase appuient la sélection rigoureuse des souches étudiées. Ce profil phénotypique sécuritaire est cohérent avec les critères d'évaluation fixés par les agences réglementaires telles que l'EFSA (l'Autorité européenne de sécurité des aliments) [202], qui stipulent qu'une souche probiotique ne doit pas présenter d'activité associée à la virulence.

Ces observations contribuent ainsi à confirmer la possibilité d'une utilisation sûre de ces souches, tant pour des applications alimentaires que cliniques, notamment dans des produits fermentés destinés à des populations sensibles.

4.4.3 Production d'amines biogènes à partir de l'histidine, la tyrosine et la lysine

La capacité des bactéries à produire des amines biogènes repose sur l'expression de décarboxylases spécifiques, qui transforment certains acides aminés en composés potentiellement toxiques, tels que la tyramine, l'histamine ou la cadavérine. Ces métabolites peuvent représenter un risque pour la santé du consommateur lorsqu'ils s'accumulent dans les aliments ou sont produits in situ dans l'intestin.

Aucune des souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* n'a été capable de décarboxyler l'histidine, la tyrosine ou la lysine pour former respectivement l'histamine, la tyramine ou la cadavérine. En revanche, toutes les souches appartenant à l'espèce *Enterococcus faecium* ont présenté une activité positive pour la tyrosine décarboxylase (TDC). Cinq souches (83,33 %) étaient négatives pour la lysine décarboxylase (LDC), à l'exception de la souche LVBBR25, capable de dégrader la lysine. Concernant l'histidine décarboxylase (HDC), 50 % des souches (LMBMR28, LMBMR23, LVBBR25) ont montré une activité positive, tandis que les 50 % restantes (LMMDR27, LMMDR16, LVBBR13) étaient négatives (voir Tableau 4.7 et Figure 4.9).

Tableau 4.7 : Profil des souches lactiques pour la décarboxylation de la tyrosine, de la lysine et de l'histidine.

Souche lactique	TDC	LDC	HDC
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>			
LMMDR33	-	-	-
LMMDR06	-	-	-
LMMDR22	-	-	-
LMMDR26	-	-	-
LMMDR05	-	-	-
LMMDR23	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>			
LMMDR27	+	-	-
LMMDR16	+	-	-
LMBMR28	+	-	+
LMBMR23	+	-	+
LVBBR25	+	+	+
LVBBR13	+	-	-

TDC : Tyrosine décarboxylase ; LDC : Lysine décarboxylase ; HDC : Histidine décarboxylase ; + : Positif ; - : Négatif.

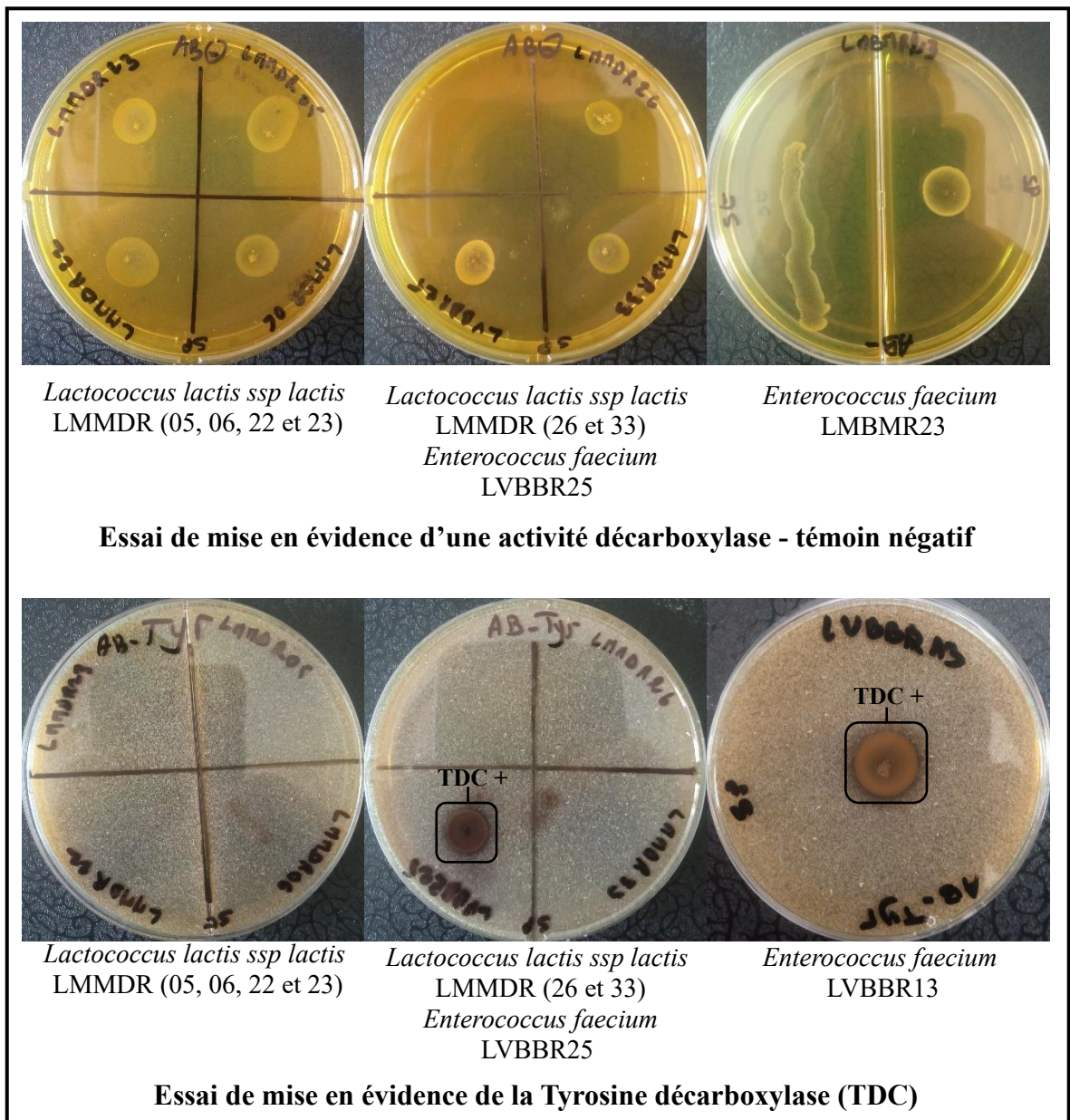


Figure 4.9 : Test de Décarboxylase (HDC, TDC et LDC) pour certaines souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* et *Enterococcus faecium*. TDC : Tyrosine décarboxylase ; LDC : Lysine décarboxylase ; HDC : Histidine décarboxylase ; + : Positif

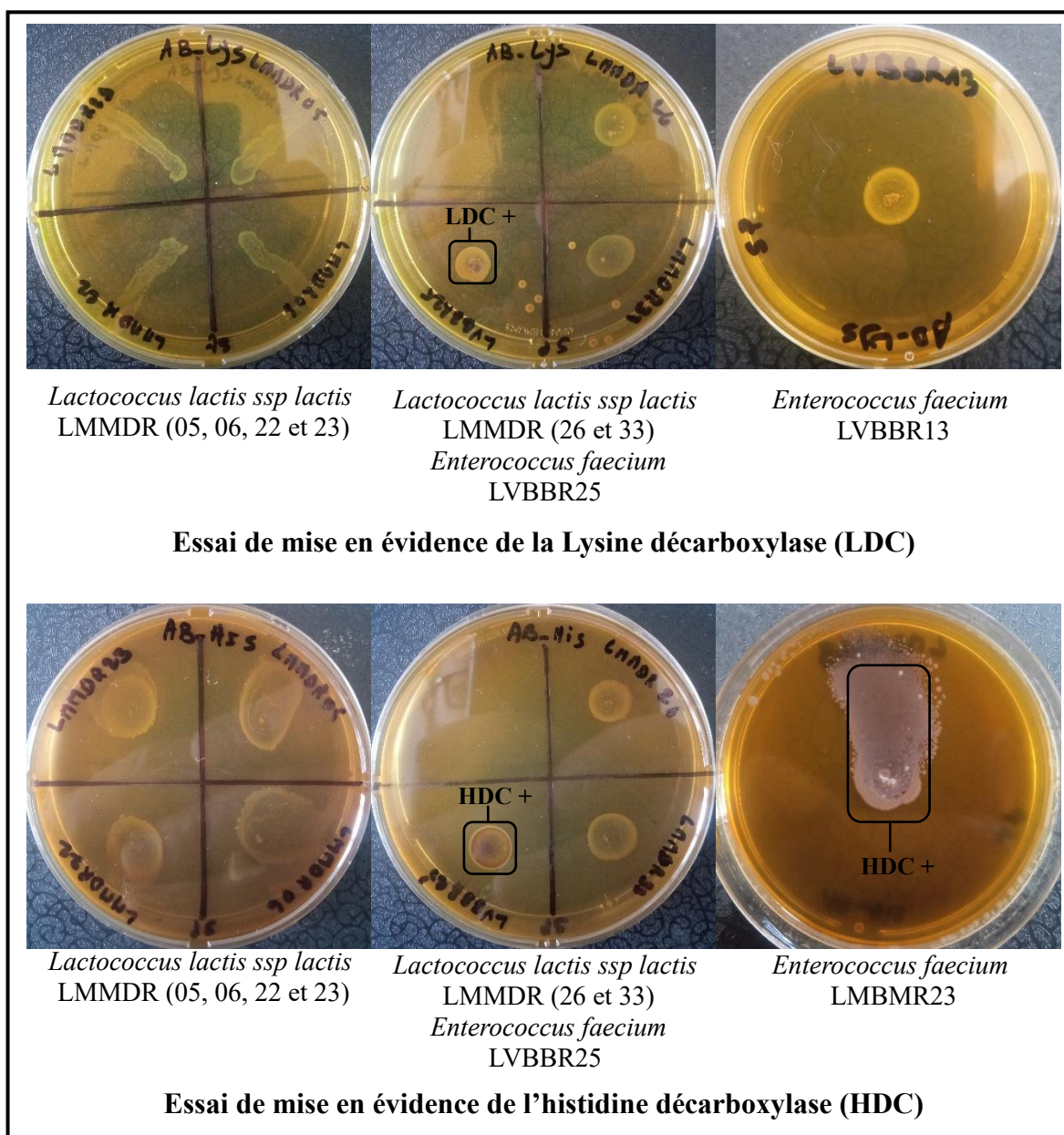


Figure 4.9 (Suite) : Test de Décarboxylase (HDC, TDC et LDC) pour certaines souches de *Lactococcus lactis ssp. lactis* et *Enterococcus faecium*. TDC : Tyrosine décarboxylase ; LDC : Lysine décarboxylase ; HDC : Histidine décarboxylase ; + : Positif

L'absence d'activité décarboxylase chez toutes les souches de *Lactococcus lactis ssp. lactis* confirme leur excellent profil sécuritaire. Cette observation est en accord avec les données de la littérature, selon lesquelles les *Lactococcus* ne produisent généralement pas d'amines biogènes et peuvent même contribuer à limiter leur accumulation dans les aliments fermentés. Tabanelli et al. [203] ont ainsi montré que certaines souches de *Lactococcus* peuvent inhiber la formation de tyramine et d'histamine dans des modèles alimentaires.

À l'inverse, la capacité de certaines souches d'*Enterococcus faecium* à produire de la tyramine et, dans une moindre mesure, de l'histamine et de la cadavérine, est bien documentée [130, 170, 196, 204]. Ces résultats justifient la prudence dans la sélection de souches à usage probiotique au sein de ce genre.

En comparant les profils obtenus, la souche LVBBR25 est considérée comme non sécuritaire, car elle exprime les trois décarboxylases (TDC, LDC, HDC) et présente plusieurs résistances aux antibiotiques. À l'inverse, les souches LMMDR27, LMMDR16 et LVBBR13 répondent aux critères d'innocuité recherchés. La souche LVBBR13 se distingue particulièrement par l'absence d'activité décarboxylase et une meilleure sensibilité antibiotique, ce qui en fait une candidate potentielle pour une valorisation probiotique ou technologique.

4.5 Aspect fonctionnel des souches lactiques sélectionnées

4.5.1 Tolérance aux conditions gastro-intestinales

Pour être qualifiées de probiotiques, les bactéries lactiques doivent survivre au passage dans le tractus gastro-intestinal, caractérisé par des conditions extrêmes telles qu'un pH très acide dans l'estomac et une forte concentration en sels biliaires dans l'intestin grêle. Ainsi, les souches lactiques sélectionnées ont été soumises à un criblage secondaire afin d'évaluer leur tolérance à ces conditions.

4.5.1.1 Tolérance aux pH acides

4.5.1.1.1 Taux de survie à pH 3

Toutes les souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* ont survécu trois heures à pH 3, avec des taux de survie variables, selon la souche et la durée d'exposition (Figure 4.10). Après une heure, une légère augmentation a été observée pour les souches LMMDR33 (106,08 % $\pm$ 0,49) et LMMDR06 (101,14 % $\pm$ 0,26), tandis que les souches LMMDR23 et LMMDR22 ont affiché des valeurs proches de 100 %. Une légère diminution a été notée pour LMMDR26 (94,02 % $\pm$ 4,99) et LMMDR05 (90,38 % $\pm$ 0,36). Après deux et trois heures, une baisse modérée a été enregistrée chez toutes les souches, avec des taux allant de 92,15 % $\pm$ 0,06 et 57,84 % $\pm$ 2,15 à trois heures.

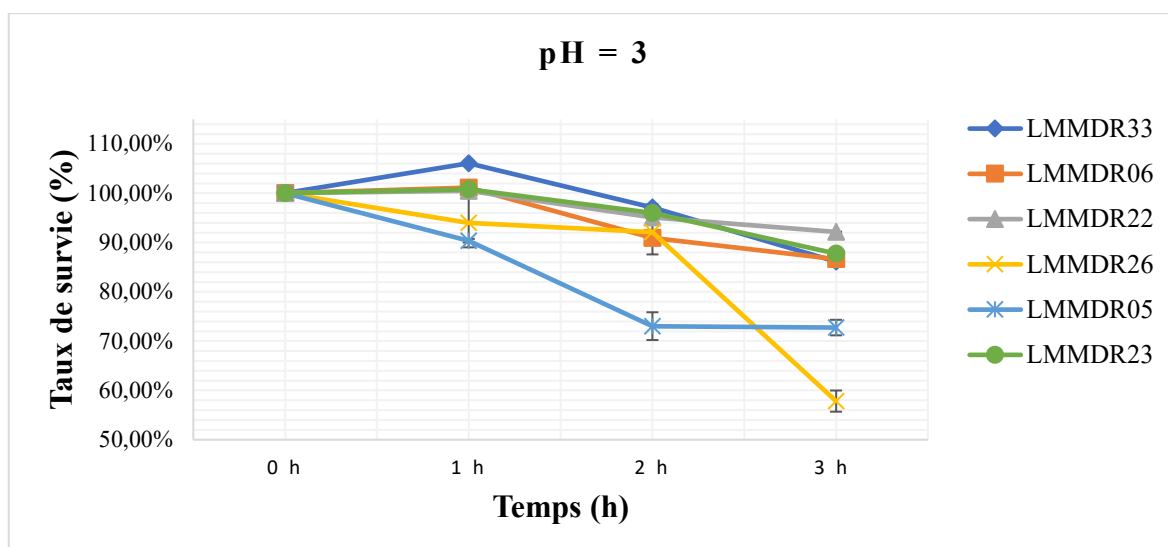


Figure 4.10 : Taux de survie (%) des souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* à un pH 3 après 1 à 3 h d'incubation

Pour les souches d'*Enterococcus faecium*, toutes ont également survécu trois heures à pH 3, avec des taux variant selon la souche et la durée (Figure 4.11). Après une heure, une légère augmentation a été observée pour les souches LMBMR23 (107,98 % $\pm$ 0,04), LVBBR25 (106,28 % $\pm$ 0,14) et LVBBR13 (103,30 % $\pm$ 0,24), tandis que LMMDR16 et LMBMR23 sont restées stables. Seule LMMDR27 a montré une légère diminution. Après deux heures, la plupart des souches ont montré une légère diminution, sauf LVBBR25 et LVBBR13 qui ont maintenu des taux supérieurs à 100 %, tandis que LMMDR27 et LMMDR16 ont présenté une légère augmentation. Après trois heures, une baisse modérée a été observée, avec des taux compris entre 102,05 % $\pm$ 0,1 et 93,75 % $\pm$ 0,12.

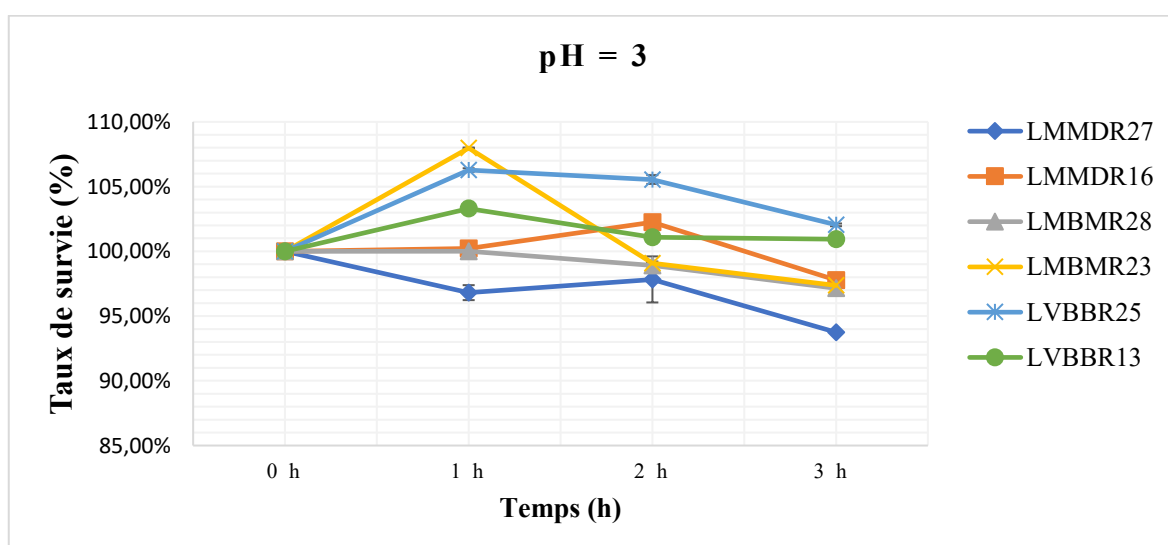


Figure 4.11 : Taux de survie (%) des souches d'*Enterococcus faecium* à un pH 3 après 1 à 3 h d'incubation.

4.5.1.1.2 Taux de survie à pH 2

Les résultats pour *Lactococcus lactis ssp lactis* à pH 2 sont illustrés en Figure 4.12. Toutes les souches ont survécu après une heure, avec des taux allant de 83,40 % $\pm$ 0,97 (LMMDR06) à 22,72 % $\pm$ 1,5 (LMMDR05). Après deux heures, la plupart ont montré une tolérance réduite, avec des taux compris entre 34,39 % $\pm$ 7,17 (LMMDR26) et 6,39 % $\pm$ 9,04 (LMMDR23). La souche LMMDR22 n'a pas survécu, tandis que LMMDR05 a montré une prolifération faible. Après trois heures, seule LMMDR06 a survécu, avec un taux de 22,62 % $\pm$ 2,34.

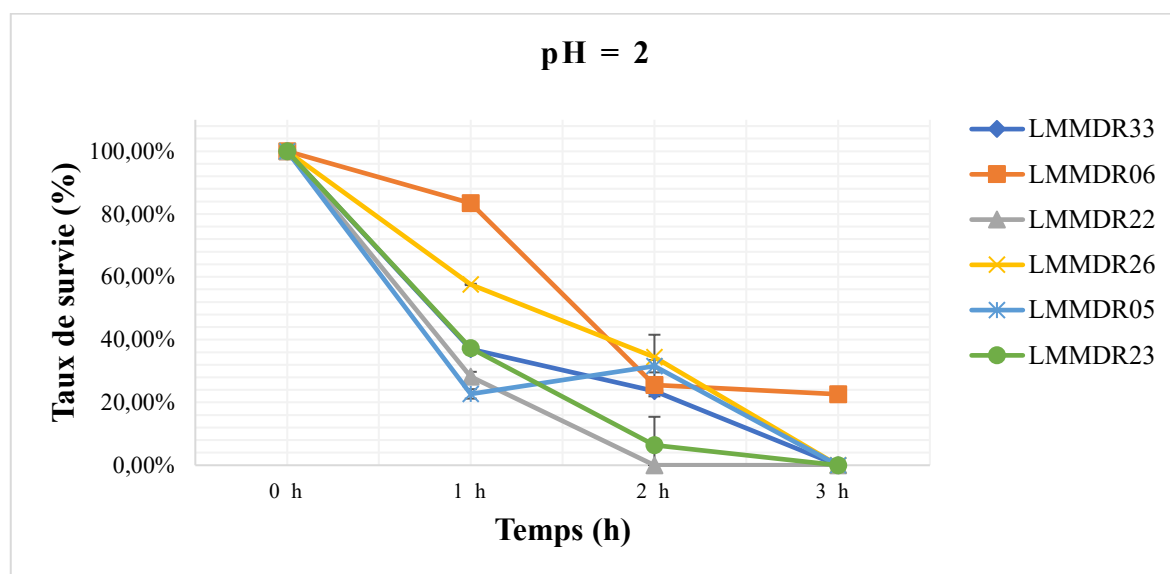


Figure 4.12 : Taux de survie (%) des souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* à un pH 2 après 1 à 3 h d'incubation

Pour les souches d'*Enterococcus faecium*, la majorité a toléré pH 2, avec des taux variables selon la souche et la durée (Figure 4.13). Après une heure, toutes ont présenté une baisse, avec des valeurs allant de 74,4 % $\pm$ 0,88 (LMMDR27) à 31,03 % $\pm$ 5,52 (LVBBR25). Après deux heures, la tendance à la baisse s'est poursuivie, à l'exception de LMMDR16 (stable) et LVBBR25 (non viable). Après trois heures, les taux ont continué de diminuer, sauf pour LMBMR28 et LMBMR23, qui ont présenté une légère prolifération. Les taux variaient entre 63,27 % $\pm$ 0,34 (LMMDR16) et 38,10 % $\pm$ 0,77 (LMBMR28).

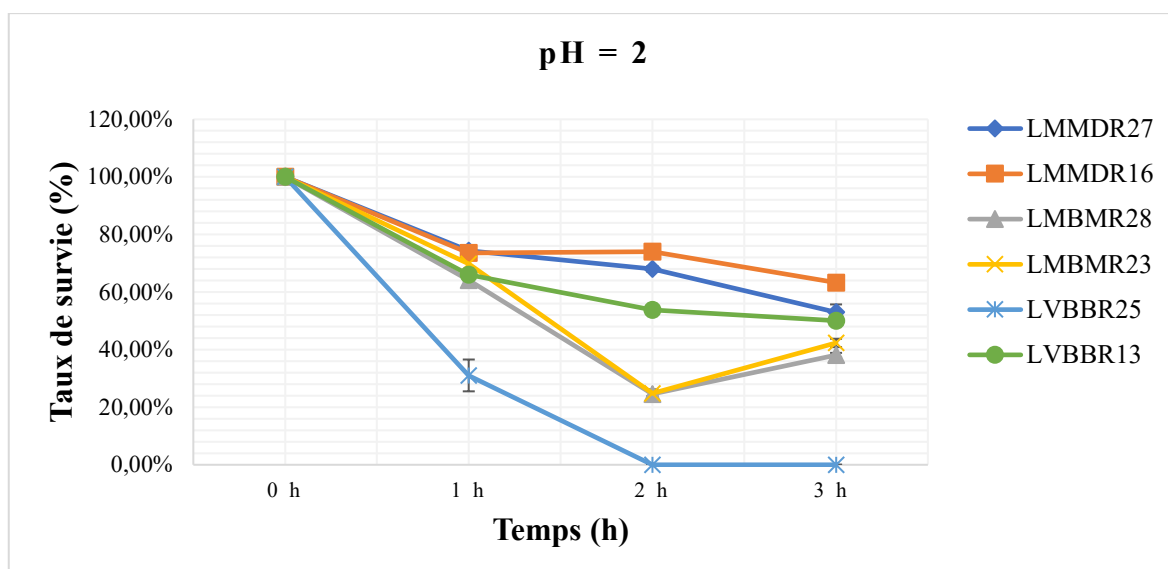


Figure 4.13 : Taux de survie (%) des souches d'*Enterococcus faecium* à un pH 2 après 1 à 3 h d'incubation

4.5.1.1.3 Taux de survie à pH 1,5

Aucune souche de *Lactococcus lactis ssp lactis* n'a survécu à pH 1,5 pendant une heure. En revanche, certaines souches d'*Enterococcus faecium* ont présenté une tolérance variable (Figure 4.14). Après une heure, les souches LVBBR13, LMMDR16, LMBMR28 et LMBMR23 ont survécu avec des taux respectifs de 48,19 % $\pm$ 0,23, 35,44 % $\pm$ 2,58, 25,14 % $\pm$ 0,75 et 16,65 % $\pm$ 2,89. Les souches LMMDR27 et LVBBR25 n'ont pas survécu. Après deux heures, seule LVBBR13 a maintenu une survie (36,68 % $\pm$ 2,62). Après trois heures, ne présentait de viabilité.

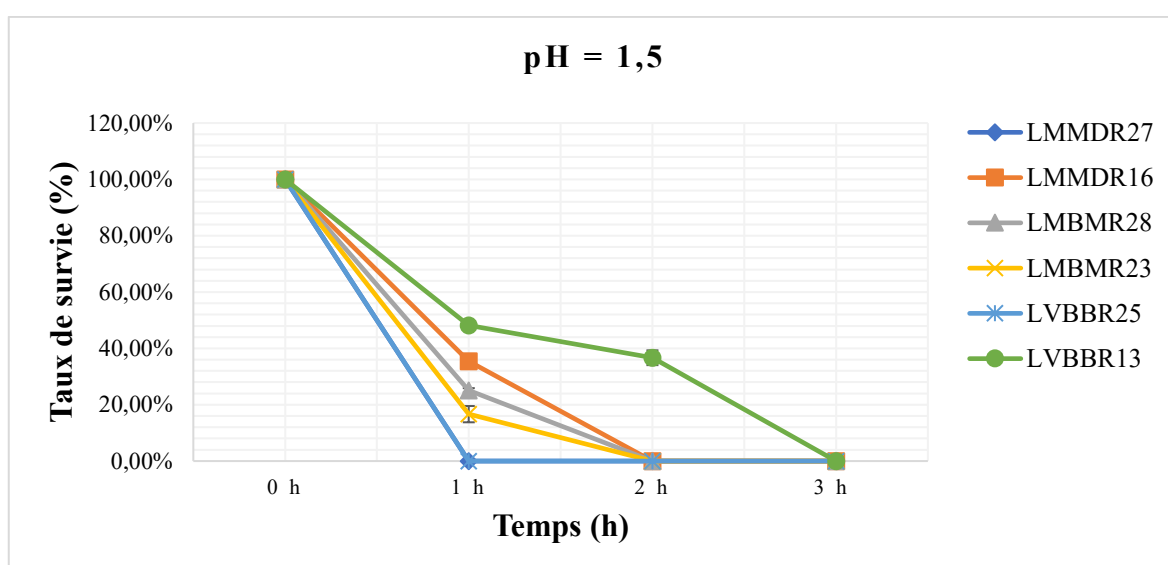


Figure 4.14 : Taux de survie (%) des souches d'*Enterococcus faecium* à un pH 1,5 après 1 à 3 h d'incubation

4.5.1.2 Résistance aux sels biliaires

4.5.1.2.1 Taux de survie à 0,3 % de sels biliaires

Les résultats relatifs à la survie des souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* à une concentration de 0,3 % en sels biliaires sont présentés en Figure 4.15. Toutes les souches ont montré une bonne tolérance à cette concentration. Après 24 heures d'incubation, une diminution des taux de survie a été observée pour la majorité des souches, à l'exception de LMMDR33 qui a présenté une légère augmentation. Les taux variaient entre 25,24 % $\pm$ 0,99 (LMMDR06) et 101,51 % $\pm$ 0,4 (LMMDR33).

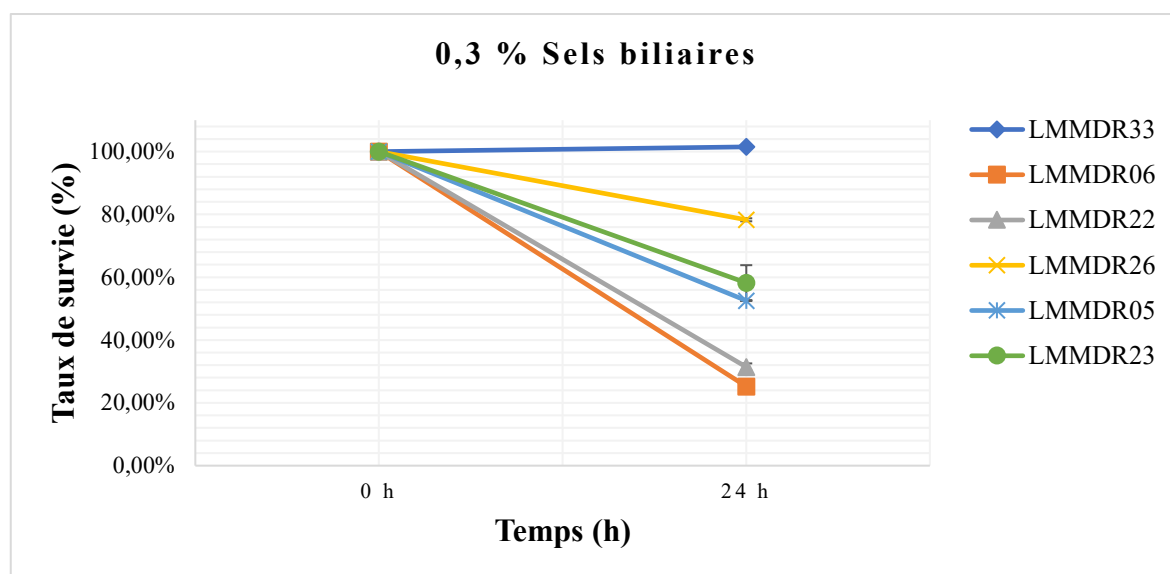


Figure 4.15 : Taux de survie (%) des souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* à une concentration de 0,3 % en sels biliaires après 24 h d'incubation

Comme illustré en Figure 4.16, toutes les souches d'*Enterococcus faecium* ont également démontré une très bonne tolérance à 0,3 % de sels biliaires. Après 24 heures, une prolifération a été observée pour les souches LVBBR25, LMMDR27 et LMMDR16, avec des taux respectifs de 106,06 % $\pm$ 0,34, 103,88 % $\pm$ 2,59 et 101,48 % $\pm$ 2,83. Les souches LMBMR28 et LMBMR23 ont maintenu des taux proches de la charge initiale, tandis que LVBBR13 a montré une légère diminution (98,41 % $\pm$ 1,11).

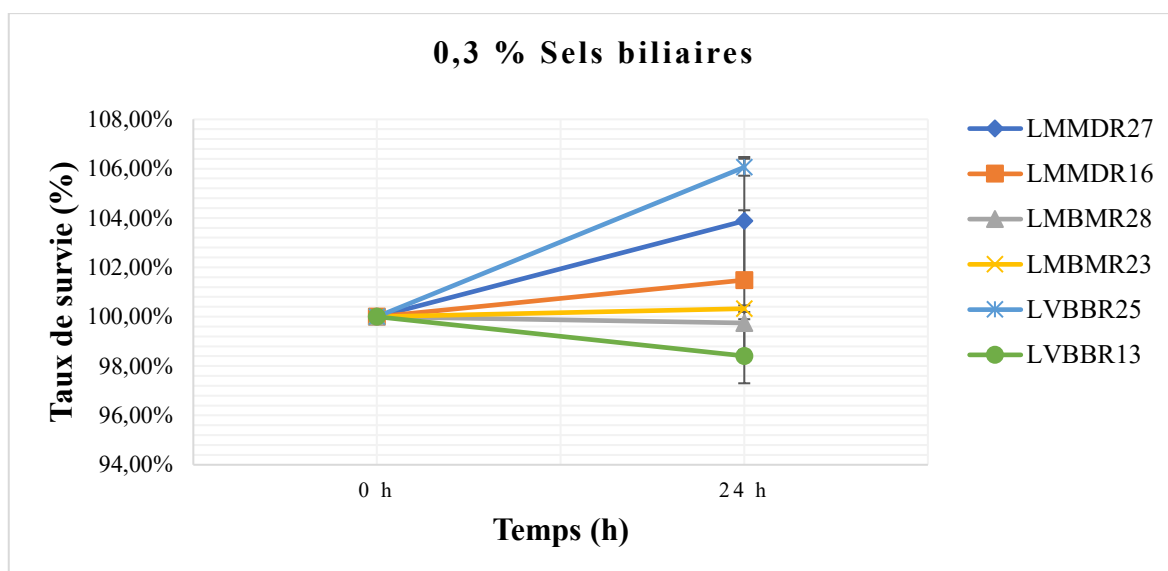


Figure 4.16 : Taux de survie (%) des souches d'*Enterococcus faecium* à une concentration de 0,3 % en sels biliaries après 24 h d'incubation

4.5.1.2.2 Taux de Survie à 0,5 % de sels biliaries

La survie des souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* à 0,5 % de sels biliaries est illustrée en Figure 4.17. Après 24 heures d'incubation, une tolérance a été constatée chez les souches LMMDR05 (97,84 % $\pm$ 0,53), LMMDR26 (72,76 % $\pm$ 7,90), LMMDR23 (72,22 % $\pm$ 2,16) et LMMDR33 (30,35 % $\pm$ 0,75). En revanche, les souches LMMDR06 et LMMDR22 se sont révélées totalement sensibles à cette concentration.

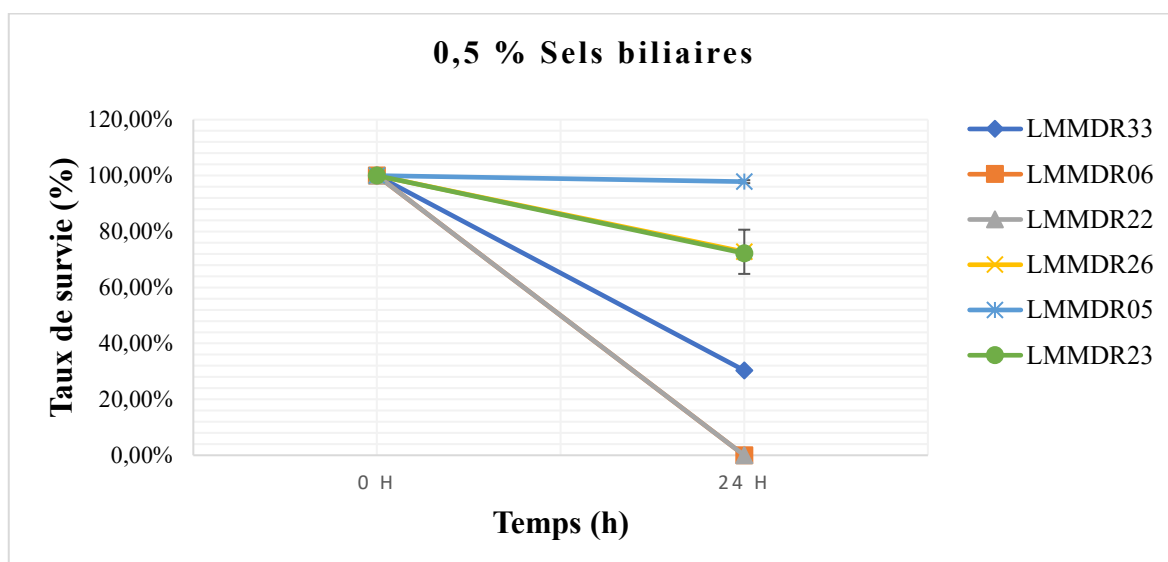


Figure 4.17 : Taux de survie (%) des souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* à une concentration de 0,5 % en sels biliaries après 24 h d'incubation

Toutes les souches d'*Enterococcus faecium* ont survécu à 0,5 % de sels biliars (Figure 4.18). Après 24 heures, une augmentation du taux de survie a été observée pour les souches LVBBR13, LMMDR16 et LMMDR27, avec des valeurs respectives de $110,04 \% \pm 0,45$, $108,95 \% \pm 1,08$ et $107,96 \% \pm 0,22$. À l'inverse, une diminution a été enregistrée pour LVBBR25 ($93,52 \% \pm 0,03$), LMBMR28 ($70,24 \% \pm 0,42$) et LMBMR23 ($30,76 \% \pm 0,57$).

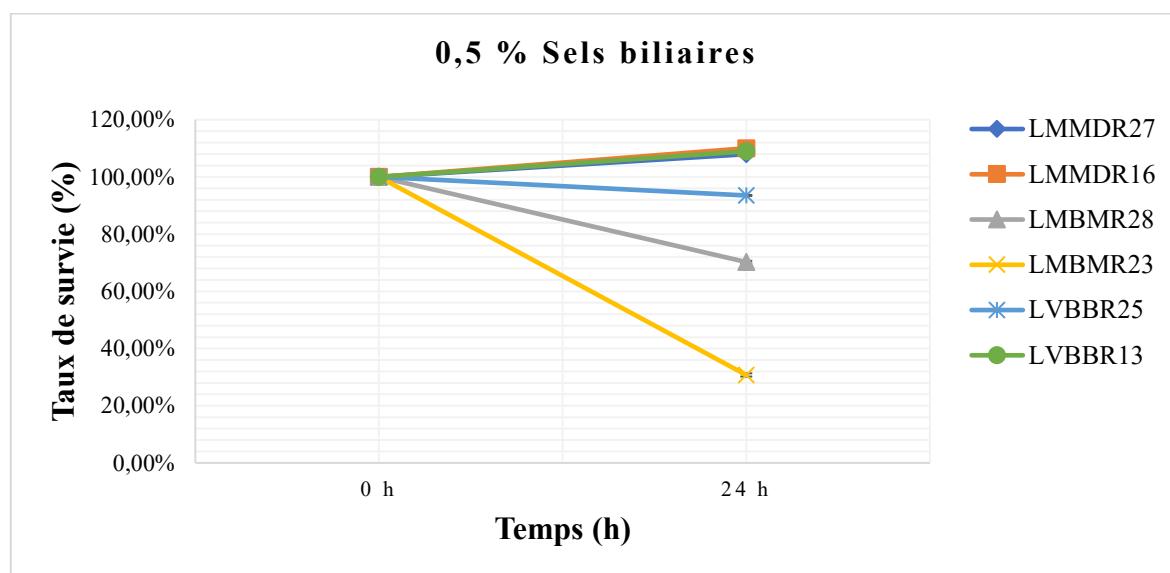


Figure 4.18 : Taux de survie (%) des souches de d'*Enterococcus faecium* à une concentration de 0,5 % en sels biliars après 24 h d'incubation

4.5.1.2.3 Taux de survie à 1 % de sels biliars

La capacité de survie des souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* à 1 % de sels biliars est présentée en Figure 4.19. Après 24 heures d'incubation, une tolérance a été observée pour les souches LMMDR26 ($95,30 \% \pm 0,38$), LMMDR05 ($69,38 \% \pm 0,39$), LMMDR23 ($47,12 \% \pm 28,10$) et LMMDR33 ($37,9 \% \pm 0,52$). Aucune survie n'a été enregistrée pour LMMDR06 et LMMDR22.

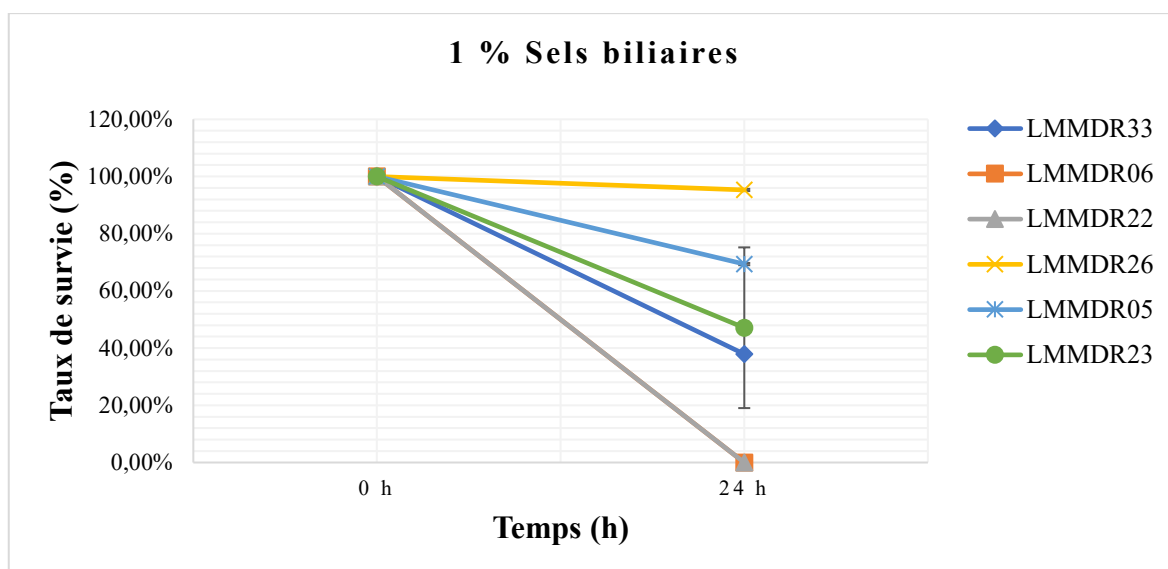


Figure 4.19 : Taux de survie (%) des souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* à une concentration de 1 % en sels biliaries après 24 h d'incubation.

Toutes les souches d'*Enterococcus faecium* ont démontré une excellente tolérance à 1 % de sels biliaries (Figure 4.20). Après 24 heures, elles ont toutes survécu, bien que les taux aient varié selon la souche. Le taux le plus élevé a été enregistré pour LVBBR13 (95,01 % $\pm$ 2,08) et le plus faible pour LVBBR25 (40,47 % $\pm$ 0,28). Il convient de noter que 83,33 % des souches ont présenté un taux de survie supérieur à 78,5 %.

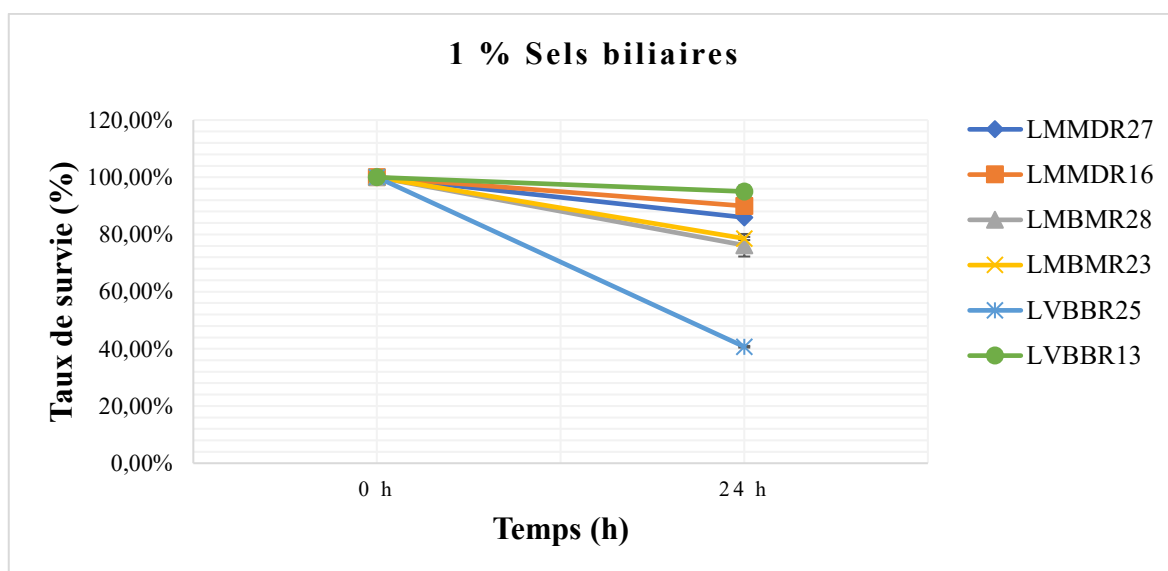


Figure 4.20 : Taux de survie (%) des souches d'*Enterococcus faecium* à une concentration de 1 % en sels biliaries.

Le passage des aliments dans le tube digestif est assuré par le phénomène de péristaltisme. Dès l'ingestion, la digestion débute dans la cavité buccale, puis se poursuit dans l'œsophage (péristaltisme de propulsion) et l'estomac (péristaltisme antral de mélange et de vidange), où les macronutriments commencent à être dégradés. Le chyme atteint ensuite le duodénum, première portion de l'intestin grêle, où la digestion se poursuit et où débute l'absorption des micronutriments. Chaque segment du tube digestif présente des conditions physico-chimiques spécifiques. L'estomac constitue une première barrière physiologique, principalement en raison de son acidité élevée. Selon Dilmi-Bouras et Sadoun [205], le pH gastrique varie entre 1,6 et 3,6, selon l'état de jeûne ou la présence d'aliments [206]. Suba et al. [207] estiment que le temps de transit gastrique est compris entre 2 et 3 heures. Quant aux lipides, leur digestion s'achève dans l'intestin grêle sous l'action des sels biliaires, qui exercent également un effet antimicrobien, constituant ainsi une seconde barrière physiologique.

Les micro-organismes sont omniprésents dans l'alimentation quotidienne, mais la majorité d'entre eux est éliminée par ces barrières physiologiques. Pour qu'une bactérie lactique soit considérée comme probiotique, elle doit être capable de survivre au transit gastro-intestinal, notamment aux conditions hostiles de l'estomac et de l'intestin grêle [208]. Selon la littérature, un probiotique efficace doit tolérer un pH inférieur ou égal à 3 et résister à une concentration minimale de 0,3 % en sels biliaires.

Dans notre étude, toutes les souches lactiques, indépendamment de leur espèce, ont démontré cette capacité, confirmant leur potentiel probiotique.

Concernant *Lactococcus lactis ssp. lactis*, nos résultats sont concordants avec ceux de Zhang et al. [209], qui ont montré que la souche *L. lactis* ZFM559 survit à pH 3 pendant 4 heures avec un taux de $64,54 \% \pm 3,10$, mais ne résiste pas à pH 2. De même, Amenu et Bacha [210] ont rapporté que, parmi 125 souches testées, 11 (soit 8,8 %) affichaient un taux de survie supérieur à 60 % après 3 heures à pH 3, tout en tolérant 0,3 % de sels biliaires pendant 24 heures, avec une résistance également observée à pH 2,5 et 2. De manière comparable, dans notre étude, la souche LMMDR06 (16,66 %) a survécu 3 heures à pH 2. Sylvere et al. [211] ont montré que la souche *L. lactis ssp. lactis* Lac3, isolée de lait fermenté, tolère un pH de 2,5 après 2 heures, mais ne survit pas à 0,3 %, 0,5 % ou 1 % de sels biliaires après 24 heures. Toutefois, après 96 heures, une reprise de croissance a été observée, suggérant un phénomène d'adaptation. Shivani et Sathiavelu [212] ont rapporté que la souche *L. lactis* MKL8 résiste

à pH 3 et pH 2 avec des taux de survie respectifs de 75 % et 72,05 % après 4 heures, et tolère 0,4 %, 0,6 % et 1 % de sels biliaires, avec des taux de survie respectifs de 83,02 %, 81,4 % et 79,04 %.

Pour les souches d'*Enterococcus faecium*, des résultats similaires ont été observés. Bs et al. [206] ont montré que la souche *E. faecium* BS5 survit 3 heures à pH 3 et pH 2 avec des taux respectifs de 76 % et 25 %, mais ne survit pas à pH 1. Moussaid et al. [213] ont rapporté que des souches d'*E. faecium* isolées du lait de chamelle marocain présentaient des taux de survie allant de 31,85 % à 96,52 % après 3 heures à pH 2,5. Rajput et al. [214] ont montré que les souches *E. faecium* GMB24 et *E. hirae* SMB16 toléraient pH 2 avec des taux de 79,73 % et 74,58 %, ainsi que des concentrations de 0,5 % et 1 % de sels biliaires avec des taux de survie supérieurs à 79 %.

Conformément à ces observations, toutes nos souches ont démontré un caractère probiotique sur la base de leur résistance à pH 3 et à 0,3 % de sels biliaires. Pour affiner la sélection, nous avons considéré la survie à pH 1,5 pendant une heure comme critère discriminant. Les souches d'*E. faecium* LMMDR16, LMBMR28, LMBMR23 et LVBBR13 ont été retenues à ce stade. Ensuite, la capacité à survivre pendant trois heures à pH 2 a conduit à l'ajout de LMMDR27 (*E. faecium*) et LMMDR06 (*L. lactis*). Enfin, la sensibilité de LMMDR06 à 1 % de sels biliaires après 24 heures a conduit à son exclusion. En définitive, les souches retenues pour la suite des analyses sont : *Enterococcus faecium* LMMDR27, LMMDR16, LMBMR28, LMBMR23 et LVBBR13.

4.5.2 Propriétés de la paroi cellulaire

Pour que les bactéries lactiques exercent leur rôle au niveau intestinal, elles doivent atteindre une concentration cellulaire suffisante. Deux propriétés, l'agrégation cellulaire et l'hydrophobicité, sont essentielles pour maintenir une concentration adéquate de bactéries viables, leur permettant de résister aux conditions hostiles du tractus digestif. L'adhésion aux cellules intestinales est étroitement liée à la structure et à la composition de la paroi cellulaire, qui implique des mécanismes spécifiques (récepteurs, protéines de surface) et non spécifiques, comme l'hydrophobicité [215]. Ces paramètres sont systématiquement évalués dans les tests de criblage des bactéries à potentiel probiotique, en vue d'applications humaines ou animales.

4.5.2.1 Capacité d'auto-agrégation

Les résultats relatifs à l'auto-agrégation des souches lactiques retenues sont présentés en Figure 4.21. Après 3 heures d'incubation, les taux d'agrégation variaient entre 8,94 % $\pm$ 4,35 (souche *E. faecium* LMMDR27) à 21,42 % $\pm$ 0,46 (souche LMBMR23). Après 24 heures, toutes les souches d'*Enterococcus faecium* ont affiché des taux supérieurs à 65 %, atteignant un maximum de 79,30 % $\pm$ 1,21 pour LMBMR28, et un minimum de 66,92 % $\pm$ 1,28 pour LMMDR27.

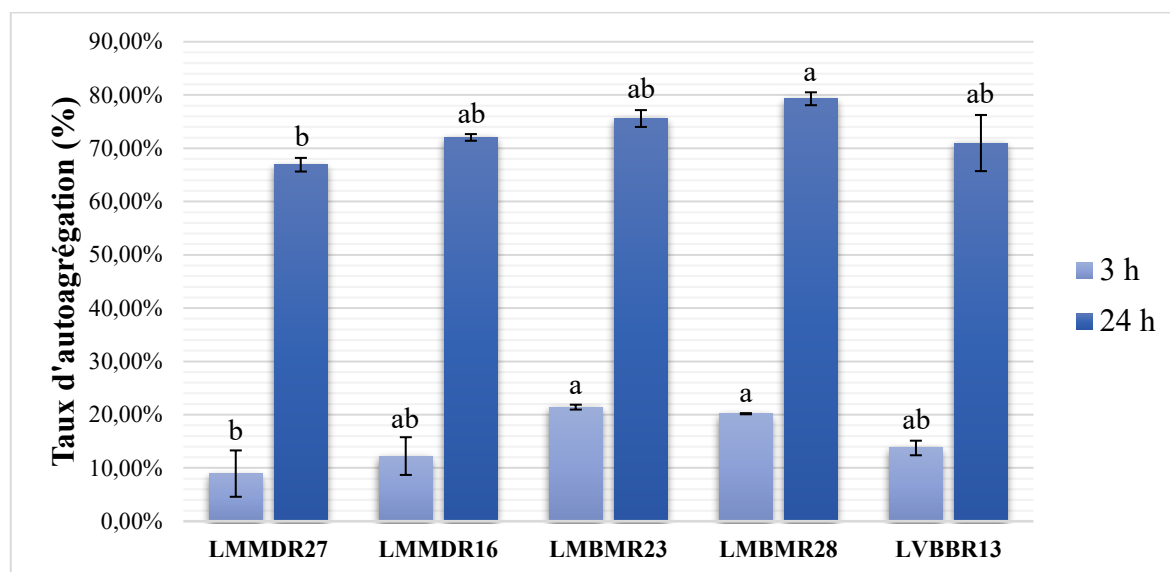


Figure 4.21 : Taux d'auto-agrégation des souches d'*Enterococcus faecium* après 3 h et 24 h

Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Sonei et al. [169] [159], qui ont observé des taux d'auto-agrégation variant entre 1,62 % et 28,44 % après 3 heures d'incubation pour la majorité des souches d'*E. faecium* et *E. faecalis* isolées de fromage, à l'exception de la souche *E. faecium* M9, qui a présenté un taux plus élevé de 37,37 %. Après 24 heures, leurs taux d'agrégation étaient légèrement inférieurs aux nôtres (entre 14,28 % et 75,3 %), bien que plusieurs souches aient affiché des valeurs similaires comprises entre 66 % et 77 %. Des résultats semblables ont été rapportés par Han et al [188] et Öztürk et al [216] pour des souches du genre *Enterococcus*, avec des taux d'agrégation compris entre 13,44 % et 25,74 % après 3 heures, et entre 9,62 % et 14,69 % après 4 heures d'incubation à 37 °C. Toutefois, après 24 heures, les taux rapportés par Öztürk et al [216] étaient plus faibles (34,33 % et 49,17 %). Collado et Meriluoto [215] ont également décrit des profils similaires chez *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, avec des taux allant de 7,4 % à 22,7 % après deux heures, et de 31,2 % à 76,4 % après 24 heures.

Un taux élevé d'auto-agrégation est considéré comme un indicateur fort de la capacité d'adhésion aux cellules intestinales (entérocytes et colonocytes), favorisant ainsi la colonisation du microbiote bénéfique tout en limitant les sites disponibles pour les agents pathogènes [169].

4.5.2.2 Hydrophobicité

Les résultats concernant l'hydrophobicité des souches d'*Enterococcus faecium*, mesurée par leur adhésion au xylène, sont présentés en Figure 4.22. Les taux obtenus diffèrent sensiblement de ceux de l'auto-agrégation, bien qu'ils restent globalement corrélés. Les valeurs les plus élevées ont été observées pour les souches LVBBR13 (55,36 % $\pm$ 3,47) et LMMDR16 (47,70 % $\pm$ 0,84). À l'opposé, la souche LMMDR27 a présenté un taux relativement faible (16,41 % $\pm$ 0,95), tandis que les plus faibles valeurs ont été enregistrées pour LMBMR28 (5,06 % $\pm$ 3,32) et LMBMR23 (2,62 % $\pm$ 1,75).

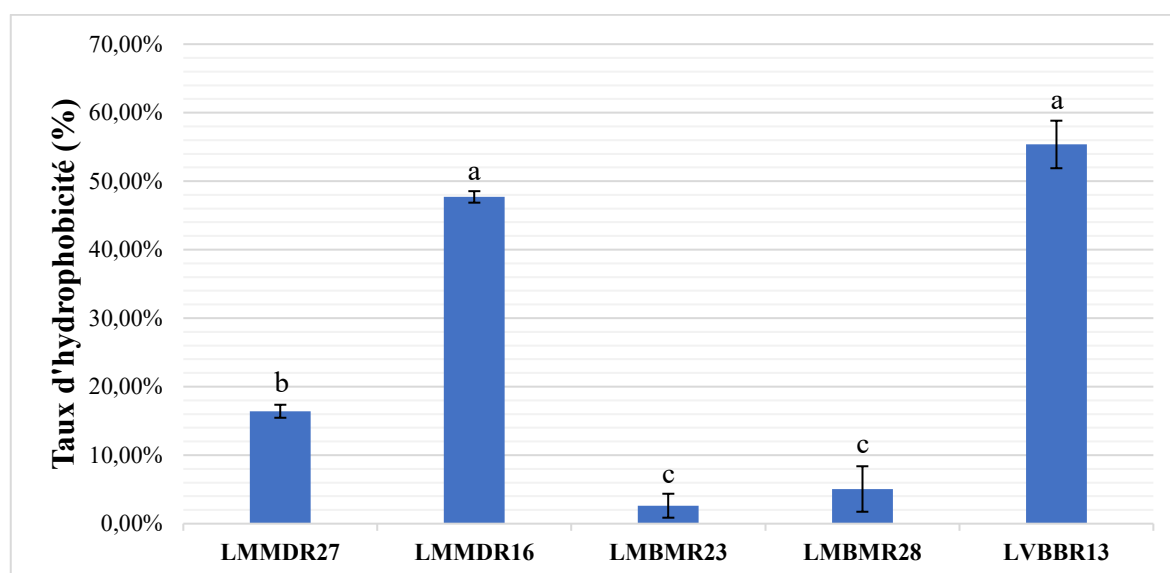


Figure 4.22 : Taux d'hydrophobicité des souches d'*Enterococcus faecium* mesuré par adhésion au xylène

Ces résultats concordent avec ceux de Sonei et al [169], qui ont observé des taux d'hydrophobicité chez les souches d'*Enterococcus* variant entre 3,46 % et 55,73 %. Oh et al [156] ont examiné des souches de bactéries lactiques isolées de soja fermenté (*Pediococcus acidilactici*, *Streptococcus thermophilus*, *E. faecium* et *Weissella cibaria*), avec des taux d'adhésion au xylène allant de 2 % à 11,8 %, et une valeur de 7,4 % pour *E. faecium* SC 54. Bautista-Gallego et al [62] ont rapporté, chez *Lactobacillus*, des valeurs comprises entre 0 % et 40 %, la majorité des souches se situant entre 0 % et 5 %. Inversement, d'autres études

ont révélé des taux d'hydrophobicité beaucoup plus élevés chez certaines souches d'*Enterococcus*, notamment Abdel Tawab et al [217] (86,40 % à 90,49 %), Han et al [188] (93,99 % à 94,99 %) et Öztürk et al [216] (47,44 % à 96,31 %), à l'exception de la souche HC161.1, qui présentait un taux plus faible (8,63 %).

Selon Moussaid et al [213], la capacité d'adhésion aux hydrocarbures est un critère supplémentaire pour évaluer le potentiel probiotique, car elle reflète en partie l'aptitude des bactéries à s'attacher aux cellules épithéliales. Toutefois, Sonei et al [169] rappellent que le taux d'hydrophobicité ne peut être utilisé comme indicateur unique d'adhésion. D'autres facteurs entrent en jeu, tels que la présence de pili, la transaldolase, ou encore le pH local du milieu, qui influencent significativement l'interaction avec les cellules intestinales de type Caco-2.

4.6 Confirmation génotypique de l'appartenance des souches retenues

Les souches présentant un profil probiotique prometteur, et initialement identifiées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF), ont été soumises à une confirmation génotypique basée sur l'analyse du gène de l'ARN ribosomal 16S.

L'amplification du gène 16S a permis d'obtenir des produits spécifiques, visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 4.23). Les fragments purifiés ont ensuite été séquencés (Appendice G), puis comparés aux séquences de référence disponibles dans la base BLAST (NCBI). L'identification des espèces a été confirmée pour chaque souche, avec des taux de similarité supérieurs à 97 %. Les séquences ont été déposées dans la base de données GenBank, et des numéros d'accès leur ont été attribués (Tableau 4.8).

Afin d'évaluer la proximité génétique entre les différentes souches d'*Enterococcus faecium*, un alignement multiple des séquences a été réalisé à l'aide du logiciel MEGA 11. L'arbre phylogénétique obtenu montre un regroupement cohérent des souches selon leur profil génétique. La souche de *Lactococcus lactis ssp. lactis* a été incluse dans l'analyse en tant que groupe externe (Figure 4.24).



Figure 4.23 : Électrophorèse des produits de PCR du gène 16S rRNA chez les souches d'*Enterococcus faecium*

Tableau 4.8 : Résultats du séquençage 16S rRNA des souches retenues

Code souche	Espèce identifiée	Similarité avec la séquence de référence	Numéro d'accèsion GenBank
LMMDR27	<i>Enterococcus faecium</i> strain HBUAS51879	97.38 %	PP389534
LMMDR16	<i>Enterococcus faecium</i> strain DG109	100%	PP389535
LMBMR23	<i>Enterococcus faecium</i> strain BIOPOP-3	100%	PP389536
LMBMR28	<i>Enterococcus faecium</i> strain BIOPOP-3	99.91%	PP389537
LVBBR13	<i>Enterococcus faecium</i> strain E1	99%	PP389538

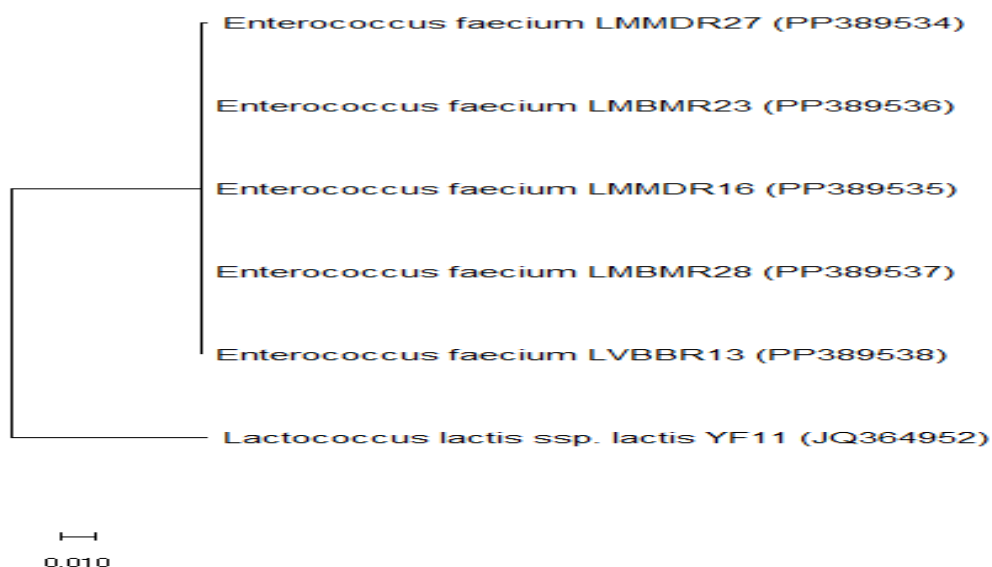


Figure 4.24 : Arbre phylogénétique basé sur la séquence 16S rRNA des souches d'*Enterococcus faecium* sélectionnées, avec *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* utilisé comme groupe externe.

4.7 Résultats moléculaires de l'aspect sécuritaire

A la suite de l'évaluation phénotypique de l'innocuité des souches, une confirmation moléculaire a été effectuée afin de rechercher la présence de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques. En effet, certains gènes peuvent être présents mais non exprimés dans certaines conditions, ce qui justifie le recours à des approches génotypiques pour garantir la sécurité des souches destinées à un usage probiotique. Au total, huit gènes ont été ciblés par PCR :

- Six gènes de virulence : *esp*, *cylA*, *gelE*, *efaAfm*, *ace*, *hyl* ;
- Deux gènes de résistance à la vancomycine : *vanA* et *vanB*.

Les fonctions associées à ces gènes sont les suivantes [131] :

- *esp* : code une protéine de surface impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales et la formation de biofilms ;
- *cylA* : code la cytolyse, une toxine protéique provoquant la lyse des érythrocytes (hémolysine) ;
- *gelE* : code une gélatinase extracellulaire, capable de dégrader des protéines telles que la gélatine, le collagène, l'hémoglobine et la fibrine ;

- efaAfm : spécifique à *E. faecium*, code une adhésine membranaire favorisant l'adhésion aux cellules cibles, impliquée notamment dans l'endocardite ;
- ace : code une protéine de liaison au collagène ;
- hyl : code une hyaluronidase, enzyme participant à la dégradation tissulaire et à la dissémination de l'infection ;
- vanA et vanB : gènes responsables de la résistance à la vancomycine.

Suite à l'analyse par PCR et électrophorèse sur gel, aucun de ces gènes n'a été détecté chez les souches d'*Enterococcus faecium* sélectionnées, confirmant leur innocuité génotypique (Figures 4.25 à 4.27).



Figure 4.25 : Électrophorèse des produits de PCR pour les gènes cylA, hyl et ace chez les souches d'*Enterococcus faecium* sélectionnées.

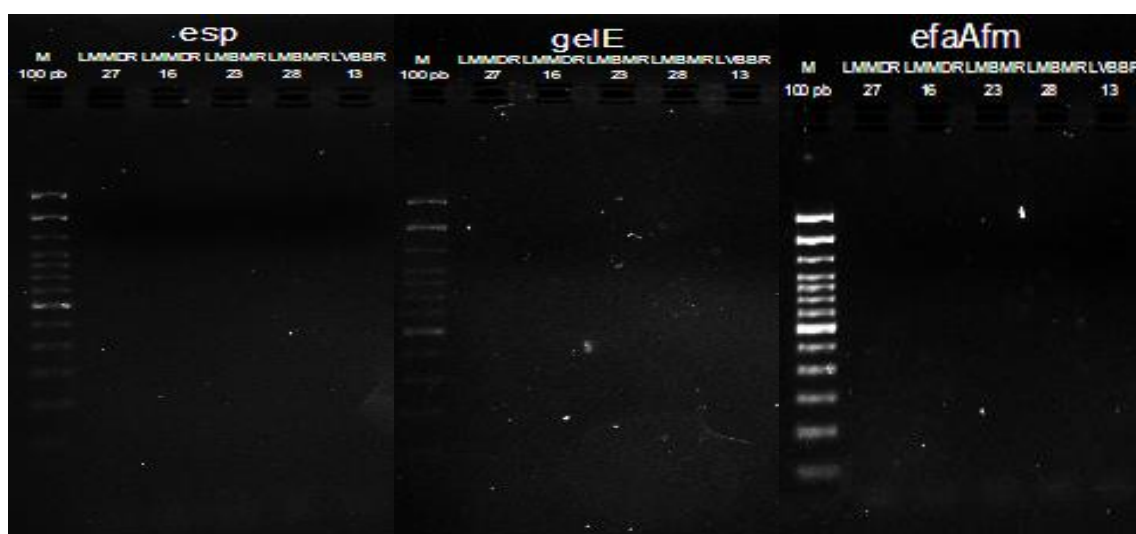


Figure 4.26 : Électrophorèse des produits de PCR pour les gènes esp, gelE et efaAfm chez les souches d'*Enterococcus faecium* sélectionnées.

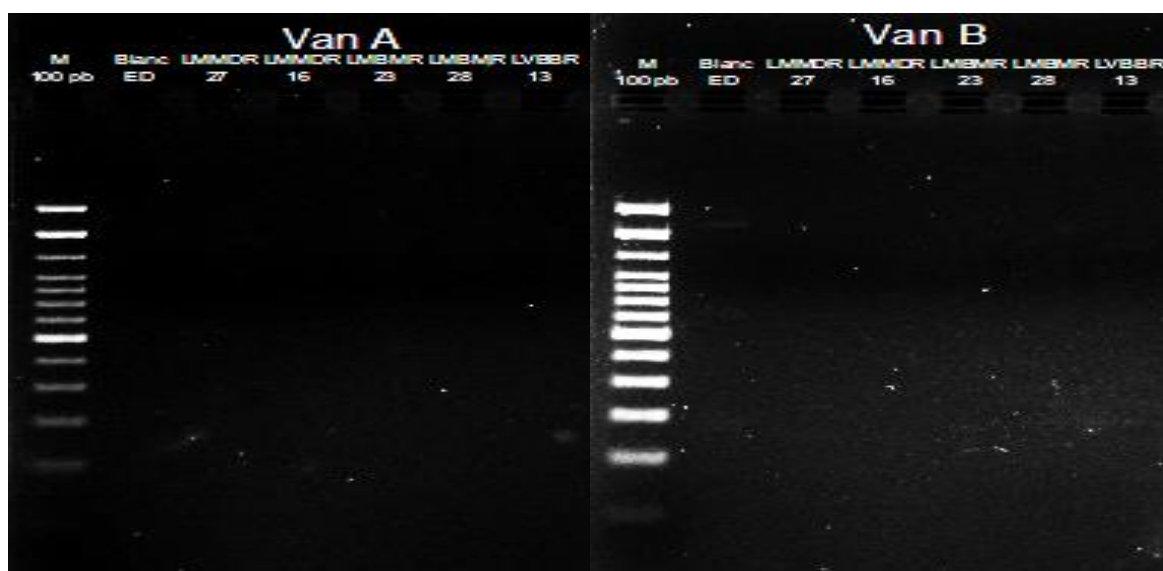


Figure 4.27 : Électrophorèse des produits de PCR pour les gènes Van A et Van B chez les souches d'*Enterococcus faecium* sélectionnées.

Ces résultats concordent avec ceux de Kouhi et al [218], qui ont montré que 6 souches sur 10 d'*Enterococcus* testées ne portaient aucun des gènes de virulence ciblés. De même, Sonei et al [169] ont rapporté que la majorité des souches analysées étaient négatives pour les gènes *gelE*, *ace*, *cylA*, *efaAfs*, *vanA* et *vanB*.

Dans une perspective probiotique, il est essentiel de démontrer rigoureusement l'innocuité des souches, en combinant les données phénotypiques et génotypiques. Les souches d'origine alimentaire présentent en général un risque plus faible que les souches cliniques. Par exemple, Eaton et Gasson [175] ont comparé des souches d'*Enterococcus* issues d'aliments, de levains industriels et d'infections humaines. Ils ont observé que les gènes de virulence sont plus fréquemment retrouvés chez *E. faecalis* que chez *E. faecium*. Cette observation a été également confirmée par Duprè et al [219]. Les souches alimentaires d'*E. faecium* sont généralement exemptes de ces gènes, à l'exception possible du gène *efaAfm*.

Toutefois, la simple présence du gène *efaAfm* ne suffit pas à qualifier une souche de virulente. Holzapfel et al [220] ont suggéré que son implication dans la virulence repose sur sa similitude partielle (73 %) avec la protéine EfaA d'*E. faecalis*, dont l'effet pathogène a été démontré dans un modèle murin de péritonite.

4.8 Profils de fermentation des hydrates de carbone sur la galerie API 50CH

Les profils fermentaires ont varié d'une souche à l'autre comme présenté dans le Tableau 4.9 et l'Appendice H. Toutes les souches d'*Enterococcus faecium* retenues ont été capables de fermenter les sucres suivants : L-arabinose, D-ribose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-mannitol, N-acétylglucosamine, arbutine, esculine, salicine, D-cellobiose, D-maltose et D-lactose. En revanche, aucune fermentation n'a été observée pour les sucres suivants : érythritol, D-arabinose, L-xylose, D-adonitol, méthyl- β -D-xylopyranoside, L-sorbose, dulcitol, inositol, D-sorbitol, méthyl- α -D-mannopyranoside, méthyl- α -D-glucopyranoside, inuline, D-mélizitose, D-raffinose, amidon, glycogène, xylitol, D-turanose, D-lyxose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, potassium 2-cétogluconate et potassium 5-cétogluconate.

Des différences entre les souches ont été observées pour la fermentation des substrats suivants : glycérol, D-xylose, L-rhamnose, amygdaline, D-melibiose, D-saccharose, D-tréhalose, gentiobiose, D-tagatose et potassium gluconate.

Un fort degré de similitude (96 %) a été observé entre les profils fermentaires des souches LMBMR23 et LMBMR28. Toutefois, des différences notables ont été relevées pour la fermentation de l'amygdaline et du gentiobiose, suggérant une divergence métabolique spécifique malgré leur proximité globale. La fermentation de sucres courants comme le lactose, le glucose et le mannitol est un avantage fonctionnel, notamment pour des applications dans les produits laitiers fermentés, où ces substrats sont naturellement disponibles [221]. À l'inverse, l'incapacité à métaboliser certains prébiotiques tels que l'inuline ou le xylitol pourrait limiter leur application dans des matrices végétales riches en fibres [222]. Ces différences, bien que mesurées *in vitro*, fournissent des indications utiles sur la plasticité enzymatique des souches [223, 224].

Tableau 4.9 : Résultats de la fermentation de différents sucres par les souches d'*Enterococcus faecium* après 48 h d'incubation.

	T	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX
LMMDR27	-	V	-	-	+	+	-	-	-	-
LMMDR16	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
LMBMR23	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
LMBMR28	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
LVBBR13	-	V	-	-	+	+	+	-	-	-
	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR
LMMDR27	+	+	+	+	-	V	-	-	+	-
LMMDR16	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
LMBMR23	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
LMBMR28	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
LVBBR13	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC
LMMDR27	-	-	+	V	+	+	+	+	+	+
LMMDR16	-	-	+	V	+	+	+	+	+	+
LMBMR23	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
LMBMR28	-	-	+	V	+	+	+	+	+	+
LVBBR13	-	-	+	V	+	+	+	+	+	+
	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN
LMMDR27	-	+	+	-	-	-	-	-	-	V
LMMDR16	V	+	+	-	-	-	-	-	-	+
LMBMR23	V	-	V	-	-	-	-	-	-	V
LMBMR28	V	-	V	-	-	-	-	-	-	V
LVBBR13	V	+	+	-	-	-	-	-	-	+
	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG
LMMDR27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMMDR16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMBMR23	-	-	+	-	-	-	-	V	-	-
LMBMR28	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
LVBBR13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) : plus de 90 % des réaction sont positives ; (-) : moins de 10 % des réactions sont positives ; (V) : plus de 10 % et moins de 90 % des réaction sont positives ; (T) : témoin.

CONCLUSION

CONCLUSION

Cette étude a permis l'isolement et la caractérisation de bactéries lactiques autochtones issues de lait cru algérien provenant de chamelle, vache, chèvre et brebis, en mettant l'accent sur leur potentiel fonctionnel et leur sécurité. Au total, 172 isolats bactériens ont été obtenus, dont 103 présentaient les caractéristiques typiques des bactéries lactiques. Parmi ceux-ci, 82 ont montré une activité antibactérienne contre quatre pathogènes alimentaires, et 12 ont été sélectionnés pour leur fort pouvoir inhibiteur.

L'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF MS a attribué ces souches à *Enterococcus faecium* (6 souches) et *Lactococcus lactis ssp. lactis* (6 souches). Des tests phénotypiques ont révélé que toutes les souches étaient sensibles à la majorité des antibiotiques, sans activité hémolytique, DNase ni gélatinase. Les souches de *L. lactis ssp. lactis* n'ont produit aucune amine biogène, tandis que celles d'*E. faecium* ont formé de la tyramine, et trois d'entre elles de l'histamine.

Un second criblage fonctionnel a mis en évidence la capacité de cinq souches d'*E. faecium* à survivre à des conditions digestives sévères. Ces souches, confirmées par séquençage 16S, ne présentaient aucun gène de virulence ni de résistance à la vancomycine. Trois d'entre elles (LMMDR27, LMMDR16 et LVBBR13) ont révélé les meilleurs profils d'adhésion, d'hydrophobicité et de fermentation glucidique (API 50 CH).

Ces résultats positionnent ces souches comme des candidates probiotiques prometteuses pour des applications dans la nutrition fonctionnelle et la sécurité alimentaire. Leur valorisation pourrait également renforcer la filière laitière algérienne, en développant des produits fermentés typiquement locaux, avec une plus-value sanitaire et économique.

Perspectives

- Séquençage complet des génomes et exploration bio-informatique des gènes d'intérêt.
- Réalisation d'essais *in vivo* pour valider l'efficacité probiotique.
- Optimisation des conditions de culture à l'échelle pilote puis industrielle.
- Étude de la stabilité et de la viabilité des souches en conditions de production et de stockage.

APPENDICES

APPENDICES

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ADNg	: Acide désoxyribonucléique génomique.
AGCC	: Acide gras à chaîne courte.
ARNr 16S	: Acide ribonucléique ribosomique de la sous-unité 16S.
ATCC	: American Type Culture Collection.
BL	: Bactéries lactiques
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool.
BMR	: Bactéries multirésistantes
DJA	: Dose Journalière Admissible.
EDTA	: acide Ethylène Diamine Tetraacétique
EFSA	: European Food Safety Authority
EPS	: Exopolysaccharides.
HDC	: Histidine décarboxylase.
IPA	: Institut Pasteur d'Algérie.
LDC	: Lysine décarboxylase.
MALDI-TOF MS	: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.
MATS	: Microbial Adhesion to Solvents.
McF	: McFarland.
MH	: Muller Hinton.
MICI	: Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin.
NCBI	: National Center for Biotechnology Information.
NSLAB	: Non Starter Lactic Acid Bacteria.
OMS	: Organisation mondiale de la santé.
PCR	: Polymerase Chain Reaction.
PK	: Phosphokétolase
SLAB	: Starter Lactic Acid Bacteria
TAE	: Tris-Acétate-EDTA
TBE	: Tris-Borate-EDTA

TDC	: Tyrosine décarboxylase.
UFC	: Unité formant de colonie.
μL	: Microlitre.
6-PG	: 6 phosphogluconate.

APPENDICE B

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

Tableau B.1 : Composition de la Gélose MRS (de Man Rogosa and Sharpe) (TM MEDIA, Inde).

Ingrédients	Quantité (g/L)
Peptone de caséine	10 g
Extrait de viande	8 g
Extrait de levure	5 g
Dextrose	20 g
Tween 80	1 mL
Di-sodium phosphate	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium	100 mg
Sulfate de manganèse	100 mg
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
Autoclavage	121°C pendant 15 Minute
pH Final à 25°C	6.5 ± 0.2

- Bouillon MRS : mêmes ingrédients de la gélose sans Agar.

Tableau B.2 : Composition de la Gélose M17 (LIOFILCHEM, Italie).

Ingrédients	Quantité (g/L)
Soytone	5 g
Peptone	2.5 g
Tryptone	2.5 g
Extrait de levure	2.5 g
Extrait de viande	5 g
Lactose	5 g
Acide ascorbique	0.5 g
Di-sodium-β-Glycérol phosphate	19 g
Sulfate de magnésium	0.25 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
Autoclavage	121°C pendant 15 Minute
pH final à 25°C	7.2 ± 0.2

- Bouillon M17 : mêmes ingrédients de la gélose sans Agar.

Tableau B.3 : Composition de la Gélose TSA (Tryptic Soy Agar) (LIOFILCHEM, Italie).

Ingrédients	Quantité (g/L)
Peptone de caséine	17 g
Peptone de soya	3 g
Chloride de sodium	5 g
Di- potassium hydrogénophosphate	2.5 g
Glucose monohydraté	2.5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
Autoclavage	121°C pendant 15 Minute
pH final à 25°C	7.3 ± 0.2

- Bouillon TSB : Mêmes ingrédients de la gélose TSA sans Agar.
- Gélose TSA molle : Mêmes ingrédients de la gélose TSA sauf que la quantité d'Agar = 7.5 g/L.

Tableau B.4 : Composition de la Gélose MH (Mueller Hinton).

Ingrédients	Quantité (g/L)
Peptone de caséine	17.5 g
Extrait de viande	2 g
Amidon soluble	1.5 g
Agar	17 g
Eau distillée	1000 mL
Autoclavage	121°C pendant 15 Minute
pH final à 25°C	7.3 ± 0.1

Tableau B.5 : Composition de la Gélose DNase (Merck, Allemagne).

Ingrédients	Quantité (g/L)
Tryptose	20 g
Chloride de sodium	5 g
Acide désoxyribonucléique	2 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
Autoclavage	121°C pendant 15 Minute
pH final à 25°C	7.3 ± 0.2

Tableau B.6 : Composition de la GN (Gélose Nutritive) (TM Media, Inde)

Ingrédients	Quantité (g/L)
Peptone	5 g
Chloride de sodium	5 g
Extrait de viande	1.5 g
Extrait de levure	1.5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL
Autoclavage	121°C pendant 15 Minute
pH final à 25°C	7.4 ± 0.2

Tableau B.7 : Composition de la Gélose Décaboxylase (DC).

Ingrédients	Quantité (g/L)
Tryptone	5 g
Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	5 g
Chloride de sodium	2.5 g
Glucose	0.5 g
Tween 80	1 mL
Sulfate de magnésium	0.2 g
Sulfate de manganèse	0.05 g
Sulfate de fer	0.04 g
Citrate d'ammonium	2 g
Thiamine (Vitamine B1)	0.01 g
Phosphate de potassium	2
Carbonate de calcium	0.1 g
Pyridoxal-5-phosphate	0.05 g
Acide aminé	10 g
Pourpre de bromocrésol	0.06g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 mL
Autoclavage	121°C pendant 10 Minute
pH final à 25°C	5.3

Tableau B.8 : Composition de médium API 50 CHL.

Ingrédients	Quantité (g/L)
Polypeptone d'origine bovin ou porcin	10 g
Extrait de levure	5 g
Tween 80	1 mL
Di-potassium phosphate	2 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de di-ammonium	2 g
Sulfate de magnésium	0.2 g
Sulfate de manganèse	0.05 g
Pourpre de bromocrésol	0.17 g
Eau distillée	1000 mL
Autoclavage	121°C pendant 15 Minute
pH final à 25°C	6.7

Tableau B.9 : Composition du tampon PBS (1X).

Ingrédients	Quantité (g/L)
Chlorure de sodium	8 g
Chlorure de potassium	0.2 g
Phosphate de sodium dibasique	1.44 g
Phosphate de potassium	0.24 g
Eau distillée	1000 mL
Autoclavage	121°C pendant 15 Minute
pH final à 25°C	7.2

Tableau B.10 : Composition du tampon TAE (1X)

Ingrédients	Quantité (g/L)
Tris	4.84 g
Acide acétique	1.14 mL
EDTA (0.5 M)	2 mL
Eau distillée	1000 mL
pH	8

Tableau B.11 : Composition du tampon TBE (1X)

Ingrédients	Quantité (g/L)
Tris	10.8 g
Acide borique	5.5 g
EDTA (0.5 M)	4 mL
Eau distillée	1000 mL
pH	8.3

APPENDICE C

METHODE DE LA COLORATION DE GRAM

- Préparation d'un frottis bien fixé.
- Recouvrir le frottis par le premier colorant « Violet de Gentiane ».
- Laisser agir pendant une minute puis rincer avec l'eau de robinet.
- Fixer le violet de gentiane par Lugol.
- Laisser agir pendant une minute puis rincer avec l'eau de robinet.
- Recouvrir le frottis par l'alcool.
- Laisser agir pendant 15 secondes puis rincer avec l'eau de robinet.
- Appliquer le second colorant « fuschine ».
- Laisser agir pendant une minute puis rincer avec l'eau de robinet.

APPENDICE D

PRINCIPE DE MALDI TOF

Après positionnement de la cible dans la chambre d'ionisation de l'instrument MALDI-TOF MS, un laser à azote émet de courtes impulsions d'énergie sur chaque échantillon. Cette énergie provoque la sublimation simultanée de la matrice et de l'échantillon microbien, entraînant leur passage de la phase solide à la phase gazeuse et l'ionisation des molécules.

Les molécules ionisées sont ensuite accélérées par un champ électrique et se déplacent dans un tube à vide vers un détecteur. Au cours de ce déplacement, elles sont séparées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). L'analyseur de masse mesure précisément le temps de vol (Time-of-Flight, TOF) nécessaire à chaque ion pour atteindre le détecteur, générant ainsi un spectre de masse caractéristique (figure 1).

La technique MALDI-TOF MS détecte principalement des protéines très abondantes, notamment des protéines ribosomales et d'autres protéines cytosoliques abondantes, ce qui permet une identification rapide et précise des micro-organismes [225].

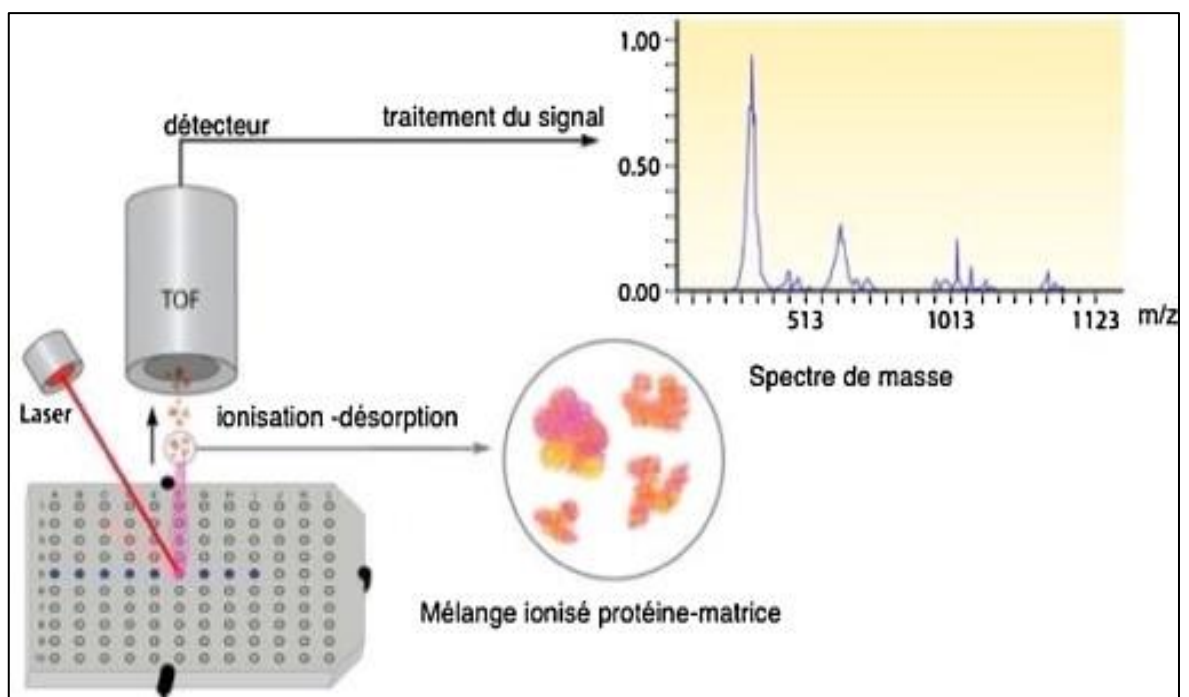


Figure D.1 : Schéma démonstratif du principe de MALDI-TOF [163]

APPENDCE E **DIAMETRES DES ZONES D’INHIBITION**

Tableau E.1 : Diamètres des zones d’inhibition (mm) de l’activité antibactérienne des souches lactiques vis-à-vis de quatre pathogènes de référence.

N°	Code de la souche lactique	Souches indicatrices			
		<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella aboney</i> NCTC 6017
1	LVBBR01	11 ± 0.00	21.5 ± 0.71	11.5 ± 0.71	21.25 ± 0.35
2	LVBBR02	12.25 ± 0.35	22.5 ± 0.71	13 ± 0.00	17.5 ± 0.71
3	LVBBR03	11.25 ± 0.35	19.5 ± 0.71	12.5 ± 0.71	18 ± 0.00
4	LVBBR04	9.5 ± 0.00	20.5 ± 0.71	14 ± 0.00	18.5 ± 0.71
5	LVBBR05	9.75 ± 0.35	17.25 ± 1.06	13 ± 1.41	18 ± 1.41
6	LVBBR06	10.25 ± 0.35	20.5 ± 0.71	15.5 ± 0.71	17.5 ± 0.71
7	LVBBR07	10.75 ± 1.06	16.75 ± 1.06	18 ± 0.00	16 ± 0.00
8	LVBBR08	10.75 ± 0.35	17.75 ± 0.35	16.5 ± 0.71	15.5 ± 0.71
9	LVBBR09	10.25 ± 0.35	19.75 ± 1.06	16 ± 1.41	16 ± 1.41
10	LVBBR10	11 ± 0.00	20 ± 0.00	14.5 ± 0.71	15.5 ± 0.71
11	LVBBR11	10 ± 0.00	17.75 ± 0.35	13.5 ± 0.71	14 ± 1.41
12	LVBBR12	10.75 ± 1.06	15.5 ± 0.71	15.5 ± 3.54	15 ± 0.00
13	LVBBR13	11.25 ± 0.35	22 ± 0.00	21 ± 0.00	16 ± 0.00
14	LVBBR14	10.25 ± 0.35	20.5 ± 0.71	17.5 ± 0.71	14.5 ± 0.71
15	LVBBR15	8.5 ± 0.71	18.25 ± 0.35	12.5 ± 0.71	15 ± 0.00
16	LVBBR16	10.75 ± 0.35	19 ± 0.00	17.5 ± 2.12	17.5 ± 0.71
17	LVBBR17	11.5 ± 0.00	18 ± 0.00	16 ± 0.00	19 ± 0.00
18	LVBBR18	11 ± 1.41	21.5 ± 0.71	14.5 ± 0.71	16 ± 0.00
19	LVBBR19	11 ± 0.71	22.5 ± 0.71	17 ± 0.00	17.5 ± 0.71
20	LVBBR20	8.5 ± 0.71	20.5 ± 0.71	13.5 ± 0.71	15.75 ± 0.35
21	LVBBR21	10 ± 0.00	20 ± 0.00	15 ± 0.00	16.5 ± 0.71
22	LVBBR22	10.5 ± 0.00	19.5 ± 0.71	14.5 ± 0.71	19.5 ± 0.71
23	LVBBR23	9.5 ± 0.71	17.5 ± 0.71	12 ± 0.00	15.75 ± 0.35
24	LVBBR24	8.75 ± 0.35	17.5 ± 0.71	12.5 ± 0.71	16.5 ± 0.71
25	LVBBR25	12.25 ± 0.35	22 ± 1.41	21 ± 1.41	15 ± 1.41
26	LVBBR26	13.25 ± 0.35	21.75 ± 1.77	20 ± 0.00	15 ± 0.00

Tableau E.1 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'activité antibactérienne des souches lactiques vis-à-vis de quatre pathogènes de référence (Suite).

N°	Code de la souche lactique	Souches indicatrices			
		<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella aboney</i> NCTC 6017
27	LVBBR27	12.25 ± 1.06	22 ± 0.00	20.5 ± 0.71	14 ± 1.41
28	LVBBR28	10.5 ± 0.71	15.5 ± 0.71	16.5 ± 0.71	12 ± 0.00
29	LVBBR31	11.25 ± 0.35	21.75 ± 0.35	14.5 ± 2.12	15 ± 0.00
30	LVBBR32	12 ± 1.41	21 ± 1.41	20 ± 1.41	12.5 ± 0.71
31	LVBBM01	6 ± 0.00	6 ± 0.00	7.75 ± 0.35	6 ± 0.00
32	LVBBM02	6 ± 0.00	6 ± 0.00	8 ± 0.00	6 ± 0.00
33	LVBBM03	6 ± 0.00	6 ± 0.00	6.75 ± 0.35	6 ± 0.00
34	LVBBM04	6 ± 0.00	6 ± 0.00	8 ± 1.41	6 ± 0.00
35	LVBBM05	6 ± 0.00	6 ± 0.00	6.75 ± 0.35	6 ± 0.00
36	LMBMR01	9.25 ± 1.77	10.5 ± 3.54	21 ± 0.00	17.5 ± 1.41
37	LMBMR03	10.75 ± 0.35	12.25 ± 2.47	17.75 ± 2.47	17.25 ± 0.35
38	LMBMR04	10.5 ± 2.12	16.25 ± 0.35	18.5 ± 2.12	15.5 ± 3.54
39	LMBMR05	11 ± 1.41	12.75 ± 0.35	19 ± 3.54	17 ± 4.24
40	LMBMR06	10.5 ± 0.71	8.5 ± 0.71	20.25 ± 1.06	18 ± 1.41
41	LMBMR07	9.75 ± 0.35	11.5 ± 0.71	19 ± 1.41	16.75 ± 0.35
42	LMBMR08	13.25 ± 0.35	15.5 ± 3.54	16.5 ± 3.54	18.25 ± 0.35
43	LMBMR09	11.75 ± 1.77	11 ± 1.41	16.75 ± 1.06	18.25 ± 1.06
44	LMBMR10	12 ± 2.83	15.5 ± 0.71	19.25 ± 1.06	18 ± 1.41
45	LMBMR11	12 ± 1.41	17.75 ± 0.35	19 ± 0.00	21.25 ± 2.47
46	LMBMR13	12.75 ± 0.35	16 ± 2.83	17.5 ± 1.41	19.5 ± 0.71
47	LMBMR14	12.5 ± 0.71	17 ± 1.41	17.25 ± 2.47	20.75 ± 0.35
48	LMBMR15	16.75 ± 6.01	15.75 ± 0.35	12.5 ± 3.54	16.5 ± 0.71
49	LMBMR16	18 ± 4.24	15 ± 0.00	16.75 ± 3.18	17.5 ± 0.71
50	LMBMR18	15.25 ± 1.06	16.75 ± 1.06	16.25 ± 1.77	15.5 ± 0.71
51	LMBMR19	16.75 ± 5.3	17 ± 1.41	14 ± 4.24	16.75 ± 1.06
52	LMBMR20	12.25 ± 2.47	15.75 ± 0.35	15 ± 1.41	17 ± 1.41
53	LMBMR21	17.5 ± 3.54	16.25 ± 0.35	16.25 ± 3.89	19.25 ± 0.35
54	LMBMR22	15.25 ± 0.35	18 ± 0.00	12.75 ± 0.35	17 ± 1.41
55	LMBMR23	18 ± 1.41	17.5 ± 0.71	15.75 ± 0.35	19.25 ± 0.35
56	LMBMR24	12.5 ± 0.71	17.75 ± 3.89	18.25 ± 0.35	17 ± 0.71

Tableau E.1 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'activité antibactérienne des souches lactiques vis-à-vis de quatre pathogènes de référence (Suite).

N°	Code de la souche lactique	Souches indicatrices			
		<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella aboney</i> NCTC 6017
57	LMBMR25	17 ± 0.71	16.5 ± 0.71	18.25 ± 1.06	17.5 ± 0.71
58	LMBMR26	15.5 ± 0.71	15.5 ± 0.71	18 ± 1.41	18.5 ± 2.12
59	LMBMR27	17.5 ± 0.71	16.25 ± 0.35	17.75 ± 0.35	18.5 ± 0.71
60	LMBMR28	14.75 ± 0.35	18.25 ± 1.06	18.5 ± 0.71	19.5 ± 0.71
61	LMBMM03	6.25 ± 0.35	6 ± 0.00	10.25 ± 1.06	6 ± 0.00
62	LMBMM05	6.5 ± 0.71	6 ± 0.00	10 ± 0.71	6 ± 0.00
63	LMBMM08	6 ± 0.00	6 ± 0.00	8 ± 0.71	6 ± 0.00
64	LMBMM10	6 ± 0.00	6 ± 0.00	8.25 ± 1.77	6 ± 0.00
65	LMBMM12	6 ± 0.00	6 ± 0.00	8.75 ± 0.35	6 ± 0.00
66	LMMDR01	10.5 ± 0.71	20.5 ± 4.95	13.5 ± 3.54	17.5 ± 0.71
67	LMMDR02	10.75 ± 1.06	19.5 ± 2.12	13.5 ± 2.12	17.75 ± 0.35
68	LMMDR03	11 ± 0.00	14 ± 1.41	21 ± 1.41	19.5 ± 0.71
69	LMMDR05	11 ± 0.00	23.5 ± 2.12	18.5 ± 3.54	19 ± 1.41
70	LMMDR06	12.25 ± 0.35	15.5 ± 0.71	20.25 ± 1.06	26.5 ± 2.12
71	LMMDR10	10.25 ± 0.35	21.5 ± 4.95	15 ± 1.41	13.5 ± 0.71
72	LMMDR13	10 ± 0.00	24.5 ± 0.71	18 ± 1.41	15 ± 4.24
73	LMMDR14	8.5 ± 0.71	16.5 ± 2.12	13 ± 1.41	11 ± 0.00
74	LMMDR15	9.5 ± 0.71	16 ± 2.83	12 ± 1.41	13.25 ± 0.35
75	LMMDR16	11.25 ± 0.35	14 ± 0.00	23 ± 1.41	27.5 ± 0.71
76	LMMDR17	10.25 ± 0.35	13 ± 2.83	19 ± 1.41	18.5 ± 0.71
77	LMMDR19	8.75 ± 1.06	23 ± 2.83	16.75 ± 1.06	18 ± 1.41
78	LMMDR22	9.75 ± 0.35	20.5 ± 3.54	25 ± 1.41	19 ± 1.41
79	LMMDR23	11.75 ± 1.06	21 ± 4.24	22 ± 2.83	15.5 ± 2.12
80	LMMDR25	9.75 ± 0.35	19 ± 4.24	19 ± 1.41	17 ± 1.41
81	LMMDR26	11.75 ± 0.35	14.5 ± 0.71	24.5 ± 2.12	23 ± 1.41
82	LMMDR27	12.25 ± 0.35	17.25 ± 1.06	25.5 ± 2.12	24 ± 1.41
83	LMMDR28	9.5 ± 0.71	19 ± 1.41	18.5 ± 2.12	16.5 ± 0.71
84	LMMDR29	9.75 ± 0.35	19.5 ± 2.12	20.5 ± 0.71	13 ± 1.41
85	LMMDR31	12.25 ± 1.06	13.5 ± 2.12	20.5 ± 2.12	20 ± 1.41
86	LMMDR32	11 ± 0.71	15.5 ± 0.71	22.5 ± 2.12	18.5 ± 0.71

Tableau E.1 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'activité antibactérienne des souches lactiques vis-à-vis de quatre pathogènes de référence (Suite).

N°	Code de la souche lactique	Souches indicatrices			
		<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Salmonella aboney</i> NCTC 6017
87	LMMDR33	12.5 ± 0.00	18.5 ± 0.71	22.75 ± 0.35	21 ± 0.00
88	LMMDR34	10 ± 1.41	17 ± 1.41	22 ± 1.41	18.75 ± 0.35
89	LMMDM08	6 ± 0.00	6 ± 0.00	12 ± 1.41	7.5 ± 2.12
90	LMMDM09	6.25 ± 0.35	6 ± 0.00	15.5 ± 0.71	7.5 ± 2.12
91	LMMDM13	6 ± 0.00	6 ± 0.00	14.75 ± 0.35	7 ± 1.41
92	LMMDM14	6 ± 0.00	6 ± 0.00	15.5 ± 2.12	6 ± 0.00
93	LMMDM15	6.5 ± 0.71	6 ± 0.00	15 ± 1.41	6.75 ± 1.06
94	LMMDM16	6 ± 0.00	6 ± 0.00	13 ± 2.83	6 ± 0.00
95	LMMDM17	6 ± 0.00	6 ± 0.00	14.5 ± 0.71	6 ± 0.00
96	LMMDM19	6 ± 0.00	6 ± 0.00	14.75 ± 0.35	6 ± 0.00
97	LMMDM20	6 ± 0.00	6 ± 0.00	14.5 ± 0.71	6 ± 0.00
98	LMMDM21	6 ± 0.00	6 ± 0.00	15 ± 0.00	6 ± 0.00
99	LBBBR01	10.75 ± 1.06	13.5 ± 0.71	15.5 ± 2.12	14.75 ± 0.35
100	LBBBR02	7 ± 0.00	20.5 ± 2.12	14 ± 0.00	10 ± 0.00
101	LBBBR03	11.75 ± 0.35	11.5 ± 0.71	15.5 ± 0.71	15.75 ± 0.35
102	LBBBR04	9.75 ± 0.35	20.5 ± 0.71	18 ± 1.41	15.5 ± 0.71
103	LCBBR04	8.25 ± 0.35	14.5 ± 3.54	15.5 ± 0.71	15 ± 1.41

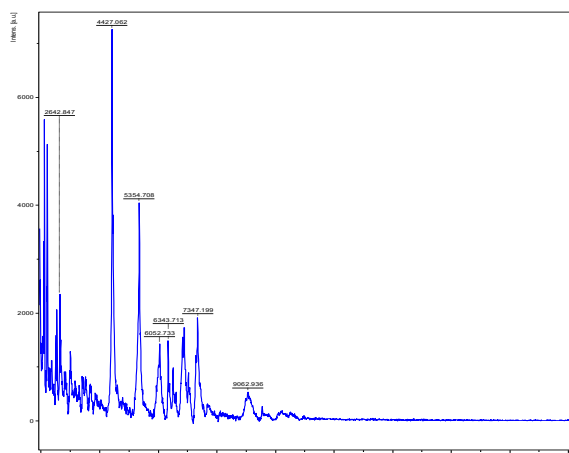
Diamètre de spot $\approx$ 6 mm ; Un diamètre $\leq$ 6 mm indique l'absence d'effet antibactérien mesurable.

LVBRR, LMBMR, LMMDR, LBBBR, LCBBR : isolées sur milieu MRS ;

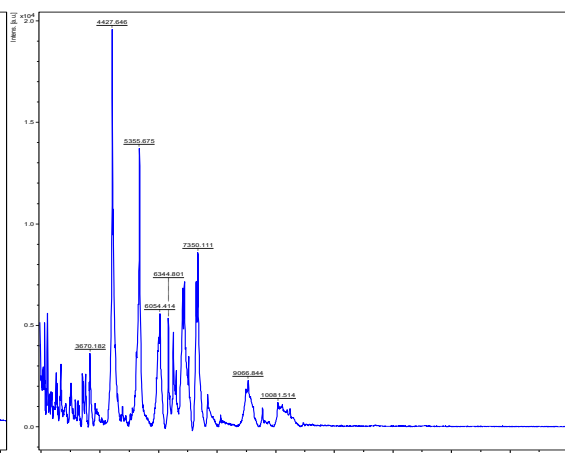
LVBMM, LMBMM, LMMDM : isolées sur milieu M17.

APPENDICE F

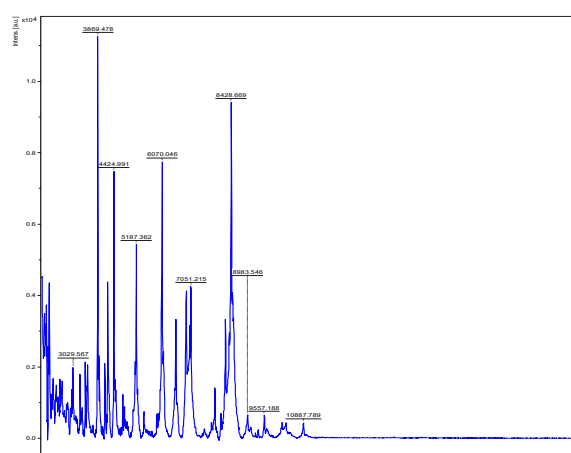
PROFILES SPECTRALES DES SOUCHES SELECTIONNEES



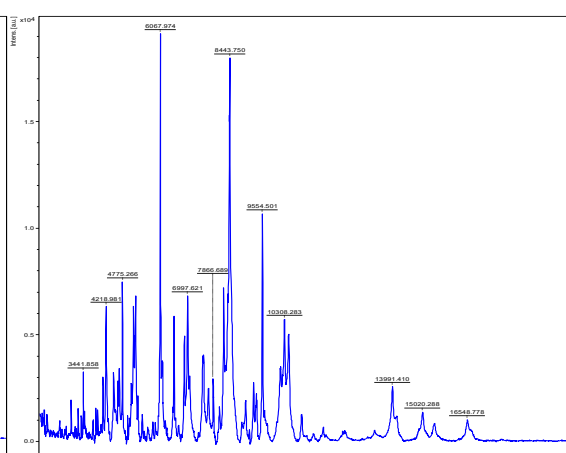
Enterococcus Faecium LMMDR27



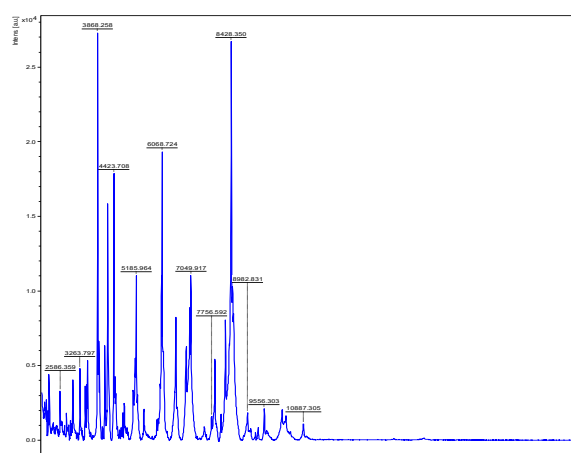
Enterococcus Faecium LMMDR16



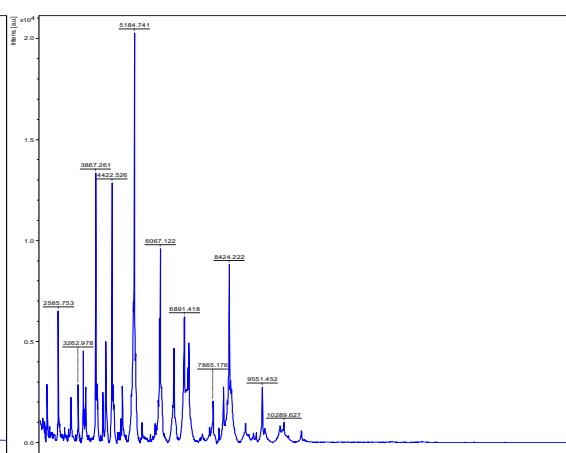
Lactococcus lastis ssp lactis LMMDR33



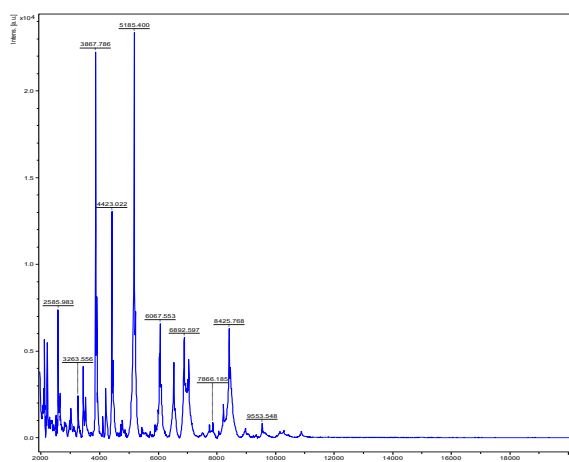
Lactococcus lastis ssp lactis LMMDR06



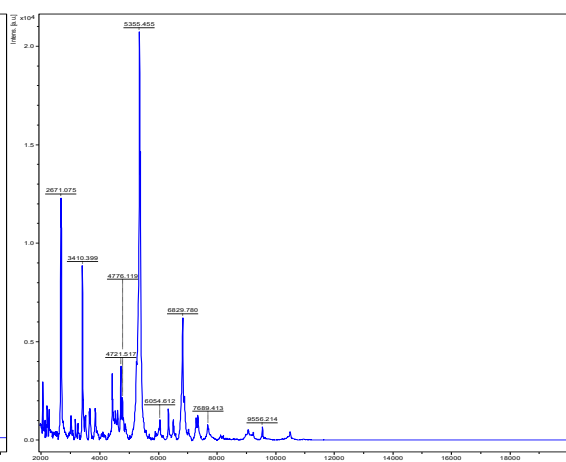
Lactococcus lastis ssp lactis LMMDR22



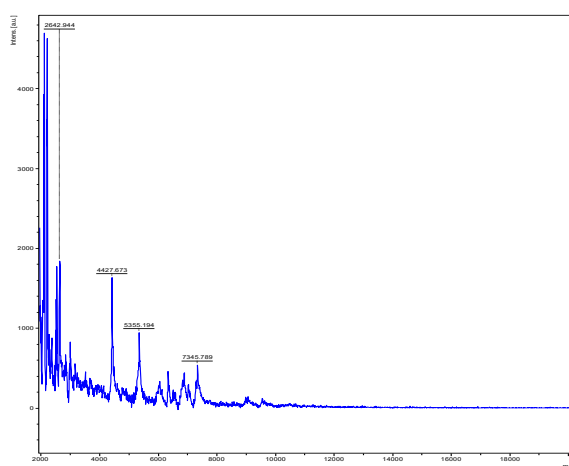
Lactococcus lastis ssp lactis LMMDR26



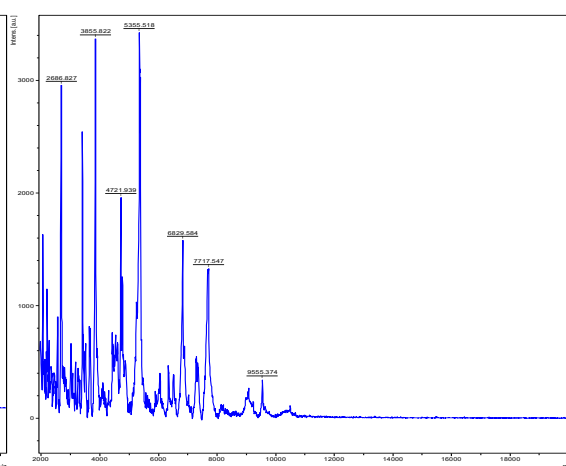
Lactococcus lastis ssp lactis LMMDR05



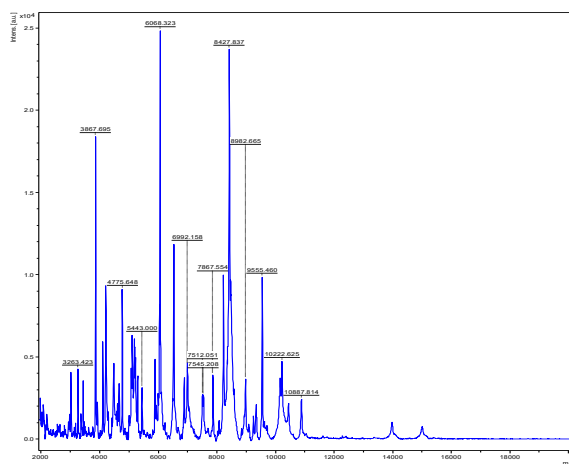
Enterococcus Faecium LMBMR28



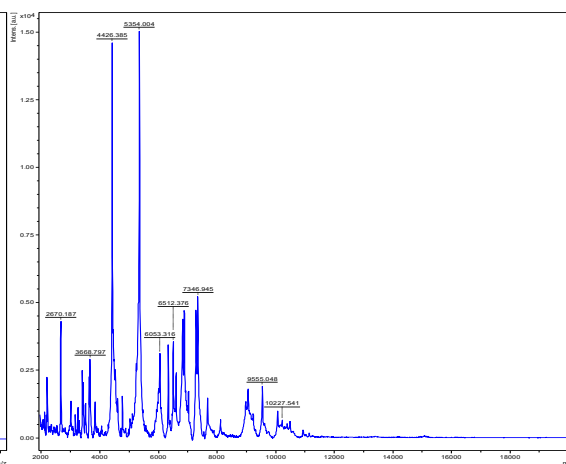
Enterococcus Faecium LMBMR23



Enterococcus Faecium LVBBR25



Lactococcus lastis ssp lactis LMMDR23



Enterococcus Faecium LVBBR13

Figure F.1 : Profils spectrométriques obtenus par MALDI-TOF MS pour les souches sélectionnées.

APPENDICE G
SEQUENCES DU GENE 16S RRNA DES SOUCHES D'ENTEROCOCCUS
FAECIUM SELECTIONNEES

LMMDR27 – *Enterococcus faecium* (GenBank : PP389534)

CACGATGCATAGCACAGACCTGAGAGGGTGATCGGCACACATTGGGTACTCGA
GACACGGACCCAAACTACCTAACAGGGAGGCAAGCAGATAGGGAATCTTCGGC
GAATGGCACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTC
GGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATC
CCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCA
GGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATT
GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTC
TGTA ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAAGTGCTAAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCC
TTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCAACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCA
AGGTTGAAACTCAAAGGAAATGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGA

LMMDR16 – *Enterococcus faecium* (GenBank : PP389535)

AAGTCGAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGT
GGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCATCAGAAGGGGATAACAC
TTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAACCGCATGGTTTTGATTTGA
AAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
GGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGA
AGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAA
CTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAG
CGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGG
AGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCA

TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
CTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGT
TTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
GCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT
TTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC

LMBMR23 – *Enterococcus faecium* (GenBank : PP389536)

GCAAGTCGAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGA
GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCATCAGAAGGGGATAAC
ACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGCATGGTTTTGATT
GAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGA
TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA
GAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGT
AACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA
AGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGG
GGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC
GGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGG
GTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
CGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC
CTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGGCAAAGTGA

LMBMDR28 – *Enterococcus faecium* (GenBank : PP389537)

GCAAGTCGAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGA
GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCATCAGAAGGGGATAAC
ACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGCATGGTTTTGATT
GAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGA
TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA
GAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGT
AACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAA
AGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGG
GGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC
GGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGG
GTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
CGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC
CTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGT
GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCTTATTGGTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCA

LVBBR13 – *Enterococcus faecium* (GenBank : PP389538)

TCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAAATTAGCTTAACCTCGCGACTTCGCAACTC
GTTGTACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGAT
TTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAGAGTGC
CCAACCTGAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC
CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTTGCC
CCCGAAGGGGAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTA
AGGTTCTTCGCGTTGCTTCCAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC
CCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTGCTACTCCCCAGGCGGAGTGC
TTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTC

ATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTT
CGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTC
TCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCA
CTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACA
TCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACG
CTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTG
GTTAGATACCGTCAAGGGATGAACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTT

APPENDICE H

PROFILS DE FERMENTATION DES HYDRATES DE CARBONE PAR LES SOUCHES D'*ENTEROCOCCUS FAECIUM* SELECTIONNEES (API 50CH)

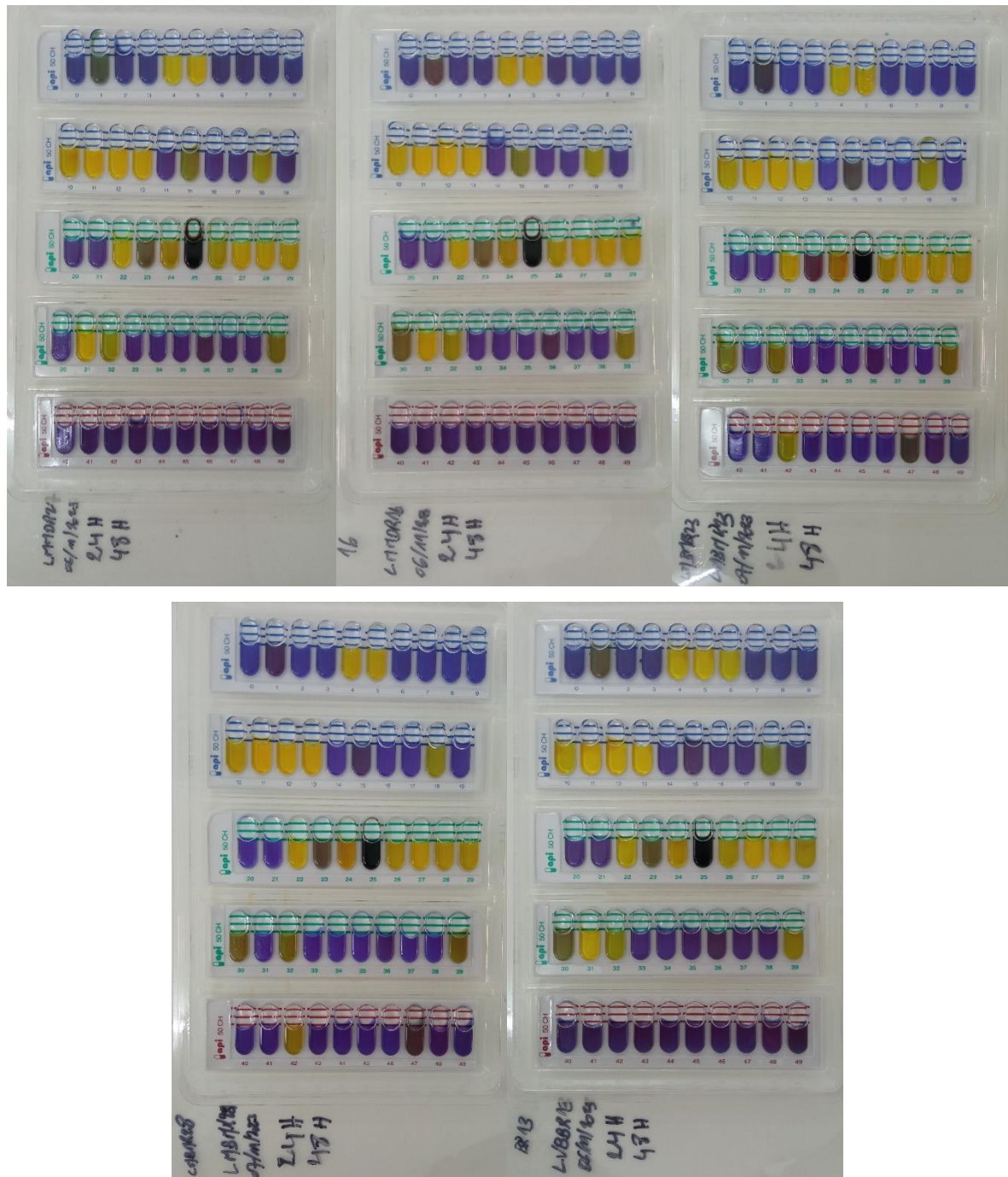


Figure H.1 : Profils de fermentation des hydrates de carbone obtenus par API 50 CH chez les souches d'*Enterococcus faecium* sélectionnée.

Tableau H.1 : Composition de la galerie API 50 CH

Bande 0 - 9

Tube	Test	Composants actifs	Quantité (mg/cupule)
0		TEMOIN	-
1	GLY	GLYcérol	1,64
2	ERY	ERYthritol	1,44
3	DARA	D-ARAbinose	1,4
4	LARA	L-ARAbinose	1,4
5	RIB	D-RIBose	1,4
6	DXYL	D-XYLose	1,4
7	LXYL	L-XYLose	1,4
8	ADO	D-ADOnitol	1,36
9	MDX	Méthyl- β -D-Xylopyranoside	1,28

Bande 10 - 19

Tube	Test	Composants actifs	Quantité (mg/cupule)
10	GAL	D-GALactose	1,4
11	GLU	D-GLUcose	1,56
12	FRU	D-FRUctose	1,4
13	MNE	D-MaNNosE	1,4
14	SBE	L-SorBosE	1,4
15	RHA	L-RHAMnose	1,36
16	DUL	DULcitol	1,36
17	INO	INOsitol	1,4
18	MAN	D-MANnitol	1,36
19	SOR	D-SORbitol	1,36

Bande 20 - 29

Tube	Test	Composants actifs	Quantité (mg/cupule)
20	MDM	Méthyl- α -D-Mannopyranoside	1,28
21	MDG	Méthyl- α -D-Glucopyranoside	1,28
22	NAG	N-AcétylGlucosamine	1,28
23	AMY	AMYgdaline	1,08
24	ARB	ARButine	1,08
25	ESC	ESCuline Citrate de fer	1,16 0,152

26	SAL	SALicine	1,04
27	CEL	D-CELlobiose	1,32
28	MAL	D-MALtose	1,4
29	LAC	D-LACtose	1,4

Bande 30 - 39

Tube	Test	Composants actifs	Quantité (mg/cupule)
30	MEL	D-MELibiose	1,32
31	SAC	D-SACcharose	1,32
32	TRE	D-TREhalose	1,32
33	INU	INUline	1,28
34	MLZ	D-MéléZitose	1,32
35	RAF	D-RAFFinose	1,56
36	AMD	AmiDon	1,28
37	GLYG	GLYcoGène	1,28
38	XLT	XyLiTol	1,4
39	GEN	GENTiobiose	0,5

Bande 40 - 49

Tube	Test	Composants actifs	Quantité (mg/cupule)
40	TUR	D-TURanose	1,32
41	LYX	D-LYXose	1,4
42	TAG	D-TAGatose	1,4
43	DFUC	D-FUCose	1,28
44	LFUC	L-FUCose	1,28
45	DARL	D-ARabitoL	1,4
46	LARL	L-ARabitoL	1,4
47	GNT	potassium GlucoNaTe	1,84
48	2KG	potassium 2-CétoGluconate	2,12
49	5KG	potassium 5-CétoGluconate	1,8

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES

- [1] Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.H., and Whitman, W. B. "Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The *Firmicutes*". Springer Science & Business Media. (2011).
- [2] Chen, P. "Chapter 24 - Lactic Acid Bacteria in Fermented Food". In Dhanasekaran, D., and Sankaranarayanan, A. (Eds.), *Advances in Probiotics*, Academic Press. (2021), 397-416.
- [3] Vasiljevic, T., and Shah, N. P. "Fermented milk: Health benefits beyond probiotic effect". *Handbook of Food Products Manufacturing*, V. 2. (2007). 99-115.
- [4] Cheruvari, A., and Kammara, R. "Bacteriocins future perspectives: Substitutes to antibiotics". *Food Control*, V. 168, (2025). 110834.
- [5] Blajman, J., Gaziano, C., Zbrun, M. V., Soto, L., Astesana, D., Berisvil, A., Scharpen, A. R., Signorini, M., and Frizzo, L. "*In vitro* and *in vivo* screening of native lactic acid bacteria toward their selection as a probiotic in broiler chickens". *Research in Veterinary Science*, V. 101, (2015). 50-56.
- [6] Ghanbari, M., Jami, M., Domig, K. J., and Kneifel, W. "Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – A review". *LWT - Food Science and Technology*, V. 54, n° 2, (2013). 315-324.
- [7] Harrati, E. "Les bactéries lactiques locales". *Algerian Annals of Agronomy*, V. 11, (1987). 67-84.
- [8] Bouchibane, M., Cheriguene, A., Chougrani, F., Bououdina, M., Kaced, A., Dahou, A. E., Benbouziane, B., and Saada, D. A. "Technological and genotypic characteristics of lactic acid bacteria isolated from Algerian artisanal dairy products". *International Dairy Journal*, V. 146, (2023). 105747.
- [9] Kouadri Boudjelthia, N., Belabbas, M., Bekenniche, N., Monnoye, M., Gérard, P., and Riazi, A. "Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Newly Isolated from Algerian Raw Cow's Milk". *Microorganisms*, V. 11, (2023). 2091.
- [10] Belkheir, K., and Laref, N. "Autochthonous Lactic Acid Bacteria from *Camelus dromedarius* Milk". *An Updated Systematic Review*. *Food Reviews International*, V. 41, (2025). 1576-1591.
- [11] Madi, N., Boukerb, A. M., Mekdade, L., Ikhlef, A., Meghezzi, A., Selmania, A., and Connil, N. "*In Vitro* and *In Silico* Assessment of the Probiotic and Technological

Potential of *Lactocaseibacillus rhamnosus* MW019593 Isolated from Algerian Cow's Milk". Probiotics and Antimicrobial Proteins. (2025).

- [12] Selvamani, S., Dailin, D. J., Gupta, V. K., Wahid, M., Keat, H. C., Natasya, K. H., Malek, R. A., Haque, S., Sayyed, R. Z., Abomoelak, B., Sukmawati, D., Varzakas, T., and El Enshasy, H. A. "An Insight into Probiotics Bio-Route: Translocation from the Mother's Gut to the Mammary Gland". Applied Sciences, V. 11, n° 16, (2021). 7247.
- [13] Das, T. K., Pradhan, S., Chakrabarti, S., Mondal, K. C., and Ghosh, K. "Current status of probiotic and related health benefits". Applied Food Research, V. 2, (2022). 100185.
- [14] Zhao, J., Zhao, F., Yuan, J., Liu, H., and Wang, Y. "Gut microbiota metabolites, redox status, and the related regulatory effects of probiotics". Heliyon, V. 9, n° 11, (2023). e21431.
- [15] Paul, J. K., Azmal, M., Haque, A. S. N. B., Meem, M., Talukder, O. F., and Ghosh, A. "Unlocking the secrets of the human gut microbiota: Comprehensive review on its role in different diseases". World Journal of Gastroenterology, V. 31, n° 5, (2025).
- [16] Tailliez, P. "Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années". Le lait, V. 81 n° 1-2, (2001). 1-11.
- [17] Sionek, B., Szydłowska, A., Küçükğöz, K., and Kołożyn-Krajewska, D. "Traditional and New Microorganisms in Lactic Acid Fermentation of Food". Fermentation, V. 9 n° 12, (2023). 1019.
- [18] Gest, H. "The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society". Notes and Records of the Royal Society of London, V. 58 n° 2, (2004). 187-201.
- [19] Liu, W., Pang, H., Zhang, H., and Cai, Y. "Biodiversity of Lactic Acid Bacteria". In Zhang, H. and Cai, Y. (Eds.), Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice, Dordrecht: Springer Netherlands. (2014). 103-203.
- [20] de Souza, E. L., de Oliveira, K. Á., and de Oliveira, M. E. G. "Influence of lactic acid bacteria metabolites on physical and chemical food properties". Current Opinion in Food Science, V. 49, (2023). 100981.
- [21] Jayasree Joshi, T., S.V, S., Mohan, L., Nandagopal, P., and Arakal, J. J. "Functional metabolites of probiotic lactic acid bacteria in fermented dairy products". Food and Humanity, V. 3, (2024). 100341.

- [22] Ludwig, W., Schleifer, K. H., and Whitman, W. B. “*Lactobacillales* ord. nov. Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria”, (2015). 1-1.
- [23] Teuber, M., Meile, L., and Schwarz, F. “Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food”. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the Sixth Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications*, Veldhoven, The Netherlands, Springer. (September 1999). 115-137
- [24] Hammes, W. P., and Hertel, C. “*Lactobacillus*”. In Trujillo M, E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey F. A., and Whitman W. B., (Eds.), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, (2015). 1-76.
- [25] Leisner, J. J., and Vancanneyt, M. “*Paralactobacillus*”. In Trujillo M, E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey F. A., and Whitman W. B., Whitman (Eds.), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, (2015). 1-4.
- [26] Holzapfel, W. H., Franz, C. M. A. P., Ludwig, W., and Dicks, L. M. T. “*Pediococcus*”. In Trujillo M, E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey F. A., and Whitman W. B., (Eds.), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, (2015). 1-15.
- [27] Švec, P., and Devriese, L. A. “*Enterococcus*”. In Trujillo M, E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey F. A., and Whitman W. B., (Eds.), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, (2015). 1-25.
- [28] Holzapfel, W. H., Björkroth, J. A., and Dicks, L. M. T. “*Leuconostoc*”. In Trujillo M, E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey F. A., and Whitman W. B., (Eds.), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, (2015). 1-23).
- [29] Björkroth, J., Dicks, L. M. T., and Holzapfel, W. H. “*Weissella*”. In Trujillo M, E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey F. A., and Whitman W. B., (Eds.), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, (2015). 1-15.
- [30] Whiley, R. A., and Hardie, J. M. “*Streptococcus*”. In Trujillo M, E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey F. A., and Whitman W. B., (Eds.), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, (2015). 1-86.
- [31] Demirci, A., Ocak, E., and Ceylan, Z. “A new nanobiotechnology material for yogurt samples: Characterized nanotubes-*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*”. *Food Bioscience*, V. 59, (2024). 104178.
- [32] Suaya, J. A., Fletcher, M. A., Georgalis, L., Arguedas, A. G., McLaughlin, J. M., Ferreira, G., Theilacker, C., Gessner, B. D., and Verstraeten, T. “Identification of

Streptococcus pneumoniae in hospital-acquired pneumonia in adults”. Journal of Hospital Infection, V. 108, (2021). 146-157.

- [33] Teuber, M. “*Lactococcus*”. In Trujillo M, E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey F. A., and Whitman W. B., (Eds.), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, (2015). 1-21).
- [34] Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D., Roncada, P., and Piras, C. “Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production”. *Journal of Proteomics*, V. 210, (2020). 103534.
- [35] Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O’Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M., and Siezen, R. “Discovering lactic acid bacteria by genomics”. In Siezen, R. J., Kok, J., Abee, T., and Schasfsma, G. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the seventh Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications*, Egmond aan Zee, the Netherlands, Dordrecht: Springer Netherlands. (September 2002). 29-58.
- [36] Kandler, O. “Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria”. *Antonie van Leeuwenhoek*, V. 49, n° 3, (1983). 209-224.
- [37] Hammes, W. P., and Vogel, R. F. “The genus *Lactobacillus*”. In Wood, B. J. B., and Holzapfel, W. H. (Eds.), *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Boston, MA: Springer US. (1995). 19-54).
- [38] Marcelli, V., Osimani, A., and Aquilanti, L. “Research progress in the use of lactic acid bacteria as natural biopreservatives against *Pseudomonas spp.* in meat and meat products: A review”. *Food Research International*, V. 196, (2024). 115129.
- [39] Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., and Geng, W. “Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry”. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, (2021). 9.
- [40] Muhialdin, B. J., Hassan, Z., and Sadon, S. K. “Biopreservation of food by lactic acid bacteria against spoilage fungi”. *Ann. food sci. Technol*, V. 12, (2011). 45-57.
- [41] Zacharof, M. P., and Lovitt, R. W. “Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article”. *APCBEE Procedia*, V. 2, (2012). 50-56.

- [42] Branco dos Santos, F., de Vos, W. M., and Teusink, B. "Towards metagenome-scale models for industrial applications—the case of Lactic Acid Bacteria". *Current Opinion in Biotechnology*, V. 24, n° 2, (2013). 200-206.
- [43] Temmerman, R., Huys, G., and Swings, J. "Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods". *Trends in Food Science and Technology*, V. 15, n° 7, (2004). 348-359.
- [44] Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O., and Yadav, H. "Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria". *Journal of digestive Diseases*, V. 9, n° 4, (2008). 190-198.
- [45] Donelli, G., Vuotto, C., and Mastromarino, P. "Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism". *Microbial Ecology in Health and Disease*, V. 24, n° 1, (2013). 20105.
- [46] Meighen, E. A. "Molecular biology of bacterial bioluminescence". *Microbiological reviews*, V. 55, n° 1, (1991). 123-142.
- [47] Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., and Viridi, J. S. "MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis". *Frontiers in Microbiology*, (2015). 6.
- [48] Lay Jr, J. O. "MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria". *Mass spectrometry reviews*, V. 20, n° 4, (2001). 172-194.
- [49] Kemp, M., Jensen, K. H., Dargis, R., and Christensen, J. J. "Routine ribosomal PCR and DNA sequencing for detection and identification of bacteria". *Future Microbiology*, V. 5, n° 7, (2010). 1101-1107.
- [50] Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., and Saito, M. "Molecular approaches to studying microbial communities: targeting the 16S ribosomal RNA gene". *Journal of UOEH*, V. 38, n° 3, (2016). 223-232.
- [51] Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T. L. "Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction". *BMC bioinformatics*, V. 13, (2012). 1-11.
- [52] Towner, K. J., and Cockayne, A. "Nucleic acid amplification and sequencing techniques". In Towner K. J. and Cockayne A. (Eds.), *Molecular Methods for Microbial Identification and Typing*, Dordrecht: Springer Netherlands. (1993). 93-122.

- [53] Kelsey, C., Dreisbach, C., Alhusen, J., and Grossmann, T. “A primer on investigating the role of the microbiome in brain and cognitive development”. *Developmental Psychobiology*, V. 61, n° 3, (2019). 341-349.
- [54] Gobetti, M., Minervini, F., Pontonio, E., Di Cagno, R., and De Angelis, M. “Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota”. *International Journal of Food Microbiology*, V. 239, (2016). 3-18.
- [55] Pradal, I., González-Alonso, V., Wardhana, Y. R., Cnockaert, M., Wieme, A. D., Vandamme, P., and De Vuyst, L. “Various cold storage-backslopping cycles show the robustness of *Limosilactobacillus fermentum* IMDO 130101 as starter culture for Type 3 sourdough production”. *International Journal of Food Microbiology*, V. 411, (2024). 110522.
- [56] Urban, J., Kareem, K. Y., Atanasov, A. G., Matuszewski, A., Bień, D., Ciborowska, P., Rygało-Galewska, A., and Michalczyk, M. “Postbiotics, a natural feed additive for growth performance, gut microbiota and quality of poultry products”. *Current Research in Biotechnology*, V. 8, (2024). 100247.
- [57] Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., Silva, R. C. d., and Ibrahim, S. A. “Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications”. *Dairy*, V. 1, n° 3, (2020). 202-232.
- [58] Dicks, L., & Botes, M. “Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action”. *Beneficial microbes*, V. 1, n° 1, (2010). 11-29.
- [59] Wang, Y., Ren, Z., Wu, Y., Li, Y., and Han, S. “Antibiotic resistance genes transfer risk: Contributions from soil erosion and sedimentation activities, agricultural cycles, and soil chemical contamination”. *Journal of Hazardous Materials*, V. 480, (2024). 136227.
- [60] Gueimonde, M., Frias, R., and Ouwehand, A. C. “Assuring the continued safety of lactic acid bacteria used as probiotics”. *Biologia*, V. 61, (2006). 755-760.
- [61] Butel, M. J. “Probiotics, gut microbiota and health”. *Médecine et Maladies Infectieuses*, V. 44, (2014). 1-8.
- [62] Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., and Cocolin, L. “Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential”. *Food Research International*, V. 50, n° 1, (2013). 135-142.
- [63] de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., and Soccol, C. R. “How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria”. *Biotechnology Advances*, V. 36, n° 8, (2018). 2060-2076.

- [64] Dinçer, E., and Kıvanç, M. “*In vitro* evaluation of probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish pastırma”. Archives of Microbiology, V. 203, n° 6, (2021). 2831-2841.
- [65] Khoo, S. C., Chin, K. W., Ting, T. Z., Luang-In, V., Chi-Wei Lan, J., and Ma, N. L. “Stress tolerance and metabolism profiling of selected functional probiotic strains”. Food Bioscience, V. 64, (2025). 105919.
- [66] Hussain, A., Shakeel, M., Khan, M. T., and Ali, S. A. “Probiotic potential and biotechnological characterization of the selected *enterococcal* strains. Food Bioscience, V. 63, (2025). 105792.
- [67] Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., and Reuter, G. “Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria”. International Journal of Food Microbiology, V. 41, n° 2, (1998). 103-125.
- [68] D’Argenio, V., and Salvatore, F. “The role of the gut microbiome in the healthy adult status”. Clinica Chimica Acta, V. 451, (2015). 97-102.
- [69] Ostaff, M. J., Stange, E. F., and Wehkamp, J. “Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology”. EMBO molecular medicine, V. 5, n° 10, (2013). 1465-1483.
- [70] Blaut, M. “Composition and Function of the Gut Microbiome. In "The Gut Microbiome in Health and Disease"" (D. Haller, ed.), pp. 5-30. Springer International Publishing, Cham. (2018).
- [71] Clemente, J. C., Manasson, J., and Scher, J. U. “The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease”. BMJ, V. 360, (2018). j5145.
- [72] Peirce, J. M., and Alviña, K. “The role of inflammation and the gut microbiome in depression and anxiety”. Journal of Neuroscience Research, V. 97, (2019). 1223-1241.
- [73] Ahmadmehrabi, S., and Tang, W. H. W. “Gut microbiome and its role in cardiovascular diseases”. Current Opinion in Cardiology, V. 32, (2017). 761-766.
- [74] Davis, C. D. “The Gut Microbiome and Its Role in Obesity”. Nutrition Today, V. 51, (2016). 167-174.
- [75] Nasri, N., Harahap, U., Silalahi, J., and Satria, D. “Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Dengke Naniura of Carp (*Cyprinus carpio*) against diarrhea-causing pathogenic bacteria”. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, V. 22, n° 8, (2021).
- [76] Wu, J., Wang, K., Wang, X., Pang, Y., and Jiang, C. “The role of the gut microbiome and its metabolites in metabolic diseases”. Protein & Cell, V. 12, (2020). 360-373.

- [77] Ahearn-Ford, S., Berrington, J. E., and Stewart, C. J. "Development of the gut microbiome in early life". *Experimental Physiology*, V. 107, (2022). 415-421.
- [78] Salgaço, M. K., Oliveira, L. G. S., Costa, G. N., Bianchi, F., and Sivieri, K. "Relationship between gut microbiota, probiotics, and type 2 diabetes mellitus". *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 103, n° 23, (2019). 9229-9238.
- [79] Altamirano-Barrera, A., Uribe, M., Chávez-Tapia, N. C., and Nuño-Lámbarri, N. "The role of the gut microbiota in the pathology and prevention of liver disease". *The Journal of Nutritional Biochemistry*, V. 60, (2018). 1-8.
- [80] Selvamani, S., Mehta, V., Ali El Enshasy, H., Thevarajoo, S., El Adawi, H., Zeini, I., Pham, K., Varzakas, T., and Abomoelak, B. "Efficacy of Probiotics-Based Interventions as Therapy for Inflammatory Bowel Disease: A Recent Update". *Saudi Journal of Biological Sciences*, V. 29, n° 5, (2022). 3546-3567.
- [81] Wang, J., Ji, H., Wang, S., Liu, H., Zhang, W., Zhang, D., and Wang, Y. "Probiotic *Lactobacillus plantarum* Promotes Intestinal Barrier Function by Strengthening the Epithelium and Modulating Gut Microbiota". *Frontiers in Microbiology*, V. 9, (2018).
- [82] Isolauri, E. "Development of healthy gut microbiota early in life". *Journal of Paediatrics and Child Health*, V. 48, (2012). 1-6.
- [83] Amara, A. A., and Shibl, A. "Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management". *Saudi Pharmaceutical Journal*, V. 23, n° 2, (2015). 107-114.
- [84] Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Vilchez-Padial, L. M., and Gil, A. "Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases". *Nutrients*, V. 9, n° 6, (2017). 555.
- [85] Coqueiro, A. Y., Raizel, R., Bonvini, A., Tirapegui, J., and Rogero, M. M. "Probiotics for inflammatory bowel diseases: a promising adjuvant treatment". *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, V. 70, n° 1, (2019). 20-29.
- [86] Derwa, Y., Gracie, D., Hamlin, P., and Ford, A. "Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease". *Alimentary pharmacology & therapeutics*, V. 46, n° 4, (2017). 389-400.
- [87] Seyedian, S. S., Nokhostin, F., and Malamir, M. D. "A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease". *Journal of medicine and life*, V. 12, n° 2, (2019). 113.
- [88] Aghamohammad, S., Sepehr, A., Miri, S. T., Najafi, S., Pourshafie, M. R., and Rohani, M. "Ameliorating inflammation in an *in vitro* model by screening the anti-

inflammatory and immunomodulatory roles of putative probiotics in inflammatory bowel disease". *Heliyon*, V. 9, n° 9, (2023). e19475.

- [89] Alard, J., Peucelle, V., Boutillier, D., Breton, J., Kuylle, S., Pot, B., Holowacz, S., and Grangette, C. "New probiotic strains for inflammatory bowel disease management identified by combining *in vitro* and *in vivo* approaches". *Beneficial microbes*, V. 9, n° 2, (2018). 317-331.
- [90] Feng, C., Zhang, W., Zhang, T., Li, B., He, Q., Kwok, L.-Y., and Zhang, H. "Oral administration of pasteurized probiotic fermented milk alleviates dextran sulfate sodium-induced inflammatory bowel disease in rats". *Journal of Functional Foods*, V. 94, (2022). 105140.
- [91] Xu, L., Liu, B., Huang, L., Li, Z., Cheng, Y., Tian, Y., Pan, G., Li, H., Xu, Y., Wu, W., Cui, Z., and Xie, L. "Probiotic Consortia and Their Metabolites Ameliorate the Symptoms of Inflammatory Bowel Diseases in a Colitis Mouse Model". *Microbiology Spectrum*, V. 10, n° 4, (2022).
- [92] Kelly, P., and Hodges, P. "Infectious diarrhoea". *Medicine*, V. 52, n° 4, (2024). 197-203.
- [93] Jain, D. L., Kudera, T., and Kokoska, L. "COMPARISON OF *IN VITRO* ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PHYTOCHEMICALS AND ANTIBIOTIC GROWTH PROMOTERS AGAINST DIARRHOEA-CAUSING PATHOGENS AND BENEFICIAL GUT BACTERIA OF LIVESTOCK". *International Journal of Infectious Diseases*, V. 134, (2023). S6.
- [94] Viswanathan, V. K., Hodges, K., and Hecht, G. "Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea". *Nature reviews microbiology*, V. 7, n° 2, (2009). 110-119.
- [95] Toualbia, M., Koiche, M., and Kerkoud, M. "Isolation, identification and characterization of *Lactobacillus plantarum* from camel milk and its antagonist effect against diarrheal bacteria". *Emirates Journal of Food and Agriculture*, V. 30, n° 4, (2018). 283-287.
- [96] Cabrera-Sosa, L., and Ochoa, T. J. "46 - *Escherichia coli* Diarrhea". In Ryan, E. T., Hill, D. R., Solomon, T., Aronson N. E. and Endy, T. P. (Eds.), *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (Tenth Edition), London: Elsevier. (2020). 481-485..
- [97] Alam, N. H., and Ashraf, H. "Treatment of Infectious Diarrhea in Children". *Pediatric Drugs*, V. 5, n° 3, (2003). 151-165.
- [98] Maldonado, N. C., Chiaraviglio, J., Bru, E., De Chazal, L., Santos, V., and Nader-Macías, M. E. F. "Effect of Milk Fermented with Lactic Acid Bacteria on Diarrheal

Incidence, Growth Performance and Microbiological and Blood Profiles of Newborn Dairy Calves”. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, V. 10, n° 4, (2018). 668-676.

- [99] Cohen, R., Minodier, P., Hau, I., Filleron, A., Werner, A., Haas, H., Raymond, J., Thollot, F., and Bellaïche, M. “Anti-infective treatment of gastro-intestinal tract infections in children”. *Infectious Diseases Now*, V. 53, (2023). 104784.
- [100] Carías Domínguez, A. M., de Jesús Rosa Salazar, D., Stefanolo, J. P., Cruz Serrano, M. C., Casas, I. C., and Zuluaga Peña, J. R. “Intestinal Dysbiosis: Exploring Definition, Associated Symptoms, and Perspectives for a Comprehensive Understanding — a Scoping Review”. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, V. 17, (2025). 440-449.
- [101] Valentino, V., Magliulo, R., Farsi, D., Cotter, P. D., O'Sullivan, O., Ercolini, D., and De Filippis, F. “Fermented foods, their microbiome and its potential in boosting human health”. *Microbial Biotechnology*, V. 17, (2024). e14428.
- [102] Cedeño-Muñoz, J. S., Aransiola, S. A., Reddy, K. V., Ranjit, P., Victor-Ekwebelem, M. O., Oyedele, O. J., Pérez-Almeida, I. B., Maddela, N. R., and Rodríguez-Díaz, J. M. “Antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes as contaminants of emerging concern: Occurrences, impacts, mitigations and future guidelines”. *Science of The Total Environment*, V. 952, (2024). 175906.
- [103] Thomas, C. M., and Nielsen, K. M. “Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria”. *Nature reviews microbiology*, V. 3, n° 9, (2005). 711-721.
- [104] Coelho MC, Malcata FX, Silva CCG. Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. *Foods* 2022;11:2276.
- [105] Chen, C., Zhao, S., Hao, G., Yu, H., Tian, H., and Zhao, G. “Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review”. *International journal of food properties*, V. 20(sup1), (2017). S316-S330.
- [106] Widyastuti, Y., Rohmatussolihat, nbsp, and Febrisiantosa, A. “The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation”. *Food and Nutrition Sciences*, V. 05 n° 04, (2014). 8.
- [107] Hu, Y., Zhang, L., Wen, R., Chen, Q., and Kong, B. “Role of lactic acid bacteria in flavor development in traditional Chinese fermented foods: A review”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, V. 62, n° 10, (2022). 2741-2755.
- [108] Yang, S., Li, W., Bai, M., Wang, J., and Sun, Z. “Analysis of cofermentation characteristics of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* based on microrheology”. *Food Bioengineering*, V. 1, (2022). 233-240.

- [109] Hosseini, F., Habibi Najafi, M. B., and Edalatian Dovom, M. R. "Screening of lactic acid bacteria for highly producing extra and intracellular folate and their potential use in production of bio-enriched yogurt". *LWT*, V. 209, (2024). 116766.
- [110] Ter, Z. Y., Chang, L. S., Babji, A. S., Zaini, N. A. M., Fazry, S., Sarbini, S. R., Peterbauer, C. K., and Lim, S. J. "A review on proteolytic fermentation of dietary protein using lactic acid bacteria for the development of novel proteolytically fermented foods". *International Journal of Food Science & Technology*, V. 59, (2024). 1213-1236.
- [111] Savijoki, K., Ingmer, H., and Varmanen, P. "Proteolytic systems of lactic acid bacteria". *Applied Microbiology and Biotechnology*, V. 71, n° 4, (2006). 394-406.
- [112] Hesseltine, C. W. "Mixed-culture fermentations. Application of biotechnology for traditional fermented foods". National Academy Press, Washington DC, (1992). 52-58.
- [113] Fox, P. F., McSweeney, P. L., Cogan, T. M., and Guinee, T. P. "Cheese: Chemistry, physics and microbiology", V. 1: General aspects," Elsevier. (2004).
- [114] Thierry, A., Valence, F., Deutsch, S.-M., Even, S., Falentin, H., Le Loir, Y., Jan, G., and Gagnaire, V. "Strain-to-strain differences within lactic and propionic acid bacteria species strongly impact the properties of cheese—A review". *Dairy Science & Technology*, V. 95, (2015). 895-918.
- [115] Złoch, M., Rafińska, K., Sugajski, M., Buszewska-Forajta, M., Walczak-Skierska, J., Railean, V., Pomastowski, P., Białczak, D., and Buszewski, B. "*Lactocaseibacillus paracasei* as a modulator of fatty acid compositions and vitamin D3 in cream". *Foods*, V. 11, (2022). 1659.
- [116] Thierry, A., Pogačić, T., Weber, M., and Lortal, S. "Production of Flavor Compounds by Lactic Acid Bacteria in Fermented Foods". In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, (2015). 314-340.
- [117] Othman, M., Ariff, A. B., Rios-Solis, L., and Halim, M. "Extractive Fermentation of Lactic Acid in Lactic Acid Bacteria Cultivation: A Review". *Frontiers in Microbiology*, V. 8 (2017).
- [118] Metrouh, R., Fares, R., Mechai, A., Debabza, M., and Menasria, T. "Technological properties and probiotic potential of *Lactiplantibacillus plantarum* SJ14 isolated from Algerian traditional cheese "Jben"". *Journal of Food Processing and Preservation*, V. 46, (2022). e16482.
- [119] Hadeif, S., Idoui, T., Sifour, M., Genay, M., and Dary-Mourot, A. "Screening of Wild Lactic Acid Bacteria from Algerian Traditional Cheeses and Goat Butter to Develop

a New Probiotic Starter Culture”. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, V. 15, (2023). 387-399.

- [120] Khalil, B., El-amine, D. A., Zakaria, M., Abderrahmen, A., Hafida, T., Houar, Y., and Abdelkader, H. “Identification and Technological Characterisation of Lactic Acid Bacteria Isolated From Traditional Algerian Cheese “J’ben””. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, V. 36, (2022). 375-379.
- [121] Belarbi, A. Y., de Almeida, O. G. G., Gatto, V., Torriani, S., del Rio, B., Ladero, V., Redruello, B., Bensalah, F., and Alvarez, M. A. “Investigating the biotechnological potential of lactic acid bacteria strains isolated from different Algerian dairy and farm sources”. *Archives of Microbiology*, (2022). 204, 220.
- [122] Abdul Manan, M. “Progress in Probiotic Science: Prospects of Functional Probiotic-Based Foods and Beverages”. *International Journal of Food Science*, (2025). 5567567.
- [123] Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. “Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties”. *Journal of Biotechnology*, V. 84, (2000). 197-215.
- [124] Jin, Y., Luo, B., Cai, J., Yang, B., Zhang, Y., Tian, F., and Ni, Y. “Evaluation of indigenous lactic acid bacteria of raw mare milk from pastoral areas in Xinjiang, China, for potential use in probiotic fermented dairy products”. *Journal of Dairy Science*, V. 104, (2021). 5166-5184.
- [125] Darilmaz, D. O., and Beyatli, Y. “Investigating Hydrophobicity and the Effect of Exopolysaccharide on Aggregation Properties of Dairy Propionibacteria Isolated from Turkish Homemade Cheeses”. *Journal of Food Protection*, V. 75, (2012). 359-365.
- [126] Greifová, G., Drobná, E., Olejníková, P., Greif, G., and Greifová, M. “Isolation, characterisation and technological properties of raw donkey's milk isolate, *Lactocaseibacillus paracasei*, compared to raw goat's and cow's milk isolates”. *Czech Journal of Food Sciences*, V. 43, (2025). 118-128.
- [127] on Additives, E. P., Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., de Lourdes Bastos, M., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., and Flachowsky, G. “Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms”. *EFSA Journal*, V. 16, (2018). e05206.
- [128] Zheng, M., Zhang, R., Tian, X., Zhou, X., Pan, X., and Wong, A. “Assessing the Risk of Probiotic Dietary Supplements in the Context of Antibiotic Resistance”. *Frontiers in Microbiology*, V. 8, (2017).

- [129] Sanders, M. E., Dirk, H., Cathy, H., T., H. J., Gabriele, H., and Huys, G. "Safety assessment of probiotics for human use". *Gut Microbes*, V. 1, (2010). 164-185.
- [130] Zommiti, M., Cambrone, M., Maillot, O., Barreau, M., Sebei, K., Feuilloley, M., Ferchichi, M., and Connil, N. "Evaluation of probiotic properties and safety of *Enterococcus faecium* isolated from artisanal Tunisian meat "Dried Ossban"". *Frontiers in Microbiology*, V. 9, (2018). 1685.
- [131] Im, E. J., Lee, H. H. Y., Kim, M., and Kim, M.-K. "Evaluation of *Enterococcal* Probiotic Usage and Review of Potential Health Benefits, Safety, and Risk of Antibiotic-Resistant Strain Emergence". *Antibiotics*, V. 12, n° 8, (2023). 1327.
- [132] Golob, M., Pate, M., Kušar, D., Dermota, U., Avberšek, J., Papić, B., and Zdovc, I. "Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from Humans and Retail Red Meat". *BioMed Research International*, (2019). 2815279.
- [133] Ben Braïek, O., and Smaoui, S. "*Enterococci*: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics". *BioMed Research International*, (2019). 5938210.
- [134] Jiménez, E., Ladero, V., Chico, I., Maldonado-Barragán, A., López, M., Martín, V., Fernández, L., Fernández, M., Álvarez, M. A., Torres, C., and Rodríguez, J. M. "Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among *enterococci* from ovine, feline, canine, porcine and human milk". *BMC Microbiology*, (2013). 13, 288.
- [135] Cariolato, D., Andrighetto, C., and Lombardi, A. "Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy". *Food Control*, V. 19, (2008). 886-892.
- [136] Sridhar, A., Ponnuchamy, M., Kumar, P. S., and Kapoor, A. "Food preservation techniques and nanotechnology for increased shelf life of fruits, vegetables, beverages and spices: a review". *Environmental Chemistry Letters*, V. 19, n° 2, (2021). 1715-1735.
- [137] Ling, B., Tang, J., Kong, F., Mitcham, E. J., and Wang, S. "Kinetics of Food Quality Changes During Thermal Processing: a Review". *Food and Bioprocess Technology*, V. 8, n° 2, (2015). 343-358.
- [138] Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., and Soccol, C. R. "Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives". *Brazilian archives of Biology and Technology*, V. 50, (2007). 512-542.
- [139] Madi, N., and Boushaba, R. "Identification of Potential Biopreservative Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Algerian Cow's Milk and Demonstration of

Antagonism Against *S. aureus* in Cheese”. Food Science and Technology Research, V. 23, n° 5, (2017). 679-688.

- [140] Kaveh, S., Hashemi, S. M. B., Abedi, E., Amiri, M. J., and Conte, F. L. “Bio-Preservation of Meat and Fermented Meat Products by Lactic Acid Bacteria Strains and Their Antibacterial Metabolites”. Sustainability, V. 15, (2023). 10154.
- [141] Gómez-Sala, B., Herranz, C., Díaz-Freitas, B., Hernández, P. E., Sala, A., and Cintas, L. M. “Strategies to increase the hygienic and economic value of fresh fish: Biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin”. International Journal of Food Microbiology, V. 223, (2016). 41-49.
- [142] Putri, D. A., Lei, J., Rossiana, N., and Syaputri, Y. “Biopreservation of Food Using Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria: Classification, Mechanisms, and Commercial Applications”. International Journal of Microbiology, (2024). 8723968.
- [143] Altieri, C., Ciuffreda, E., Di Maggio, B., and Sinigaglia, M. “Lactic acid bacteria as starter cultures”. In "Starter Cultures in Food Production", (2017). 1-15.
- [144] Belkacem, R., Benameur, Q., Crăciun, S., Lengliz, S., Kilani, H., Nadăș, G. C., Györke, A., and Abbassi, M. S. “First report of enterocin genes in autochthonous *Lactocaseibacillus paracasei* and *Levilactobacillus brevis* strains isolated from artisanal dairy products made from raw cow milk”. International Dairy Journal, V. 169, (2025). 106337.
- [145] Mefleh, M., Darwish, A. M. G., Mudgil, P., Maqsood, S., and Boukid, F. “Traditional Fermented Dairy Products in Southern Mediterranean Countries: From Tradition to Innovation”. Fermentation, V. 8, (2022). 743.
- [146] Karim, M., Fouad, Z. A., Kheira, B., and Mebrouk, K. “Microbiological diversity and biotechnological characteristics of the dominant indigenous lactic microflora in Algerian traditional butter (Dhan)”. South Asian Journal of Experimental Biology, (2022). 12.
- [147] Bouchibane, M., Touzout, N., Ait Saada, D., Dahou, A. E., Boumediene, F., Hamed, D., Toumi, S., and Cheriguene, A. “Assessing *Lactobacilli* strains from Algerian traditional dairy products for probiotic potential benefits”. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, V. 63, (2025). 103472.
- [148] Chadli, A., Benbouziane, B., Boudroua, K., Bentahar, M., and Benabdelmoumene, D. “Assessment of potential probiotic properties and biotechnological activities of *lactobacillus* strains isolated from traditional algerian fermented wheat ELHAMOUM”. Asian Journal of Dairy and Food Research, (2024).

- [149] Merzoug, M., Bendida, K., Aireche, M., Zater, Z. Y., Brakna, C. N., Hammadi, A. I., Saidi, Y., Todorov, S. D., and Saidi, D. "Isolation and Characterization of Enterocin-Producing *Enterococcus faecium* Strains from Algerian Traditional Food "Dried Figs Marinated in Olive Oil": Functional and Safety Evaluations". *Foods*, V. 14, (2025). 766.
- [150] Dahiya, D., and Nigam, P. S. "Antibiotic-Therapy-Induced Gut Dysbiosis Affecting Gut Microbiota—Brain Axis and Cognition: Restoration by Intake of Probiotics and Synbiotics". *International Journal of Molecular Sciences*, V. 24, (2023). 3074.
- [151] Morgan, T. G. *Guide to good dairy farming practice*: Fao. (2004).
- [152] Fugl, A., Berhe, T., Kiran, A., Hussain, S., Laursen, M. F., Bahl, M. I., Hailu, Y., Sørensen, K. I., Guya, M. E., Ipsen, R., and Hansen, E. B. "Characterisation of lactic acid bacteria in spontaneously fermented camel milk and selection of strains for fermentation of camel milk". *International Dairy Journal*, V. 73, (2017). 19-24.
- [153] de Man, J. d., Rogosa, d., and Sharpe, M. E. "A medium for the cultivation of *lactobacilli*". *Journal of applied microbiology*, V. 23, n° 1, (1960). 130-135.
- [154] Terzaghi, B. E., and Sandine, W. "Improved medium for lactic *streptococci* and their bacteriophages". *Applied microbiology*, V. 29, n° 6, (1975). 807-813.
- [155] Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B. M., Henni, D., and Kihal, M. "Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races". *Food microbiology*, V. 21, n° 5, (2004). 579-588.
- [156] Oh, A., Daliri, E. B.-M., and Oh, D. H. "Screening for potential probiotic bacteria from Korean fermented soybean paste: *In vitro* and *Caenorhabditis elegans* model testing". *LWT*, 88, (2018). 132-138.
- [157] Rezapour, S., Ghahremani, E., and Mardani, M. "Analysis of antibiotic resistance and antimicrobial effects of *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* isolated from Khorramabad traditional cheeses". *Journal of Applied Biotechnology Reports*, V. 2, n° 1, (2015). 211-214.
- [158] Schillinger, U., and Lücke, F.-K. "Identification of *lactobacilli* from meat and meat products". *Food microbiology*, V. 4, n° 3, (1987). 199-208.
- [159] González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J., Fresno, J., and Tornadijo, M. "Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity". *Food Control*, V. 18, n° 6, (2007). 716-722.

- [160] Akhmetsadykova, S., Baubekova, A., Konuspayeva, G., Akhmetsadykov, N., Faye, B., and Loiseau, G. "Lactic acid bacteria biodiversity in raw and fermented camel milk". (2015).
- [161] Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., García-Fraile, P., Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., González-Buitrago, J. M., and Velázquez, E. "MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family *Rhizobiaceae*". PLoS One, V. 6, n° 5, (2011). e20223.
- [162] Sogawa, K., Watanabe, M., Sato, K., Segawa, S., Ishii, C., Miyabe, A., Murata, S., Saito, T., and Nomura, F. "Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms". Analytical and bioanalytical chemistry, V. 400, (2011). 1905-1911.
- [163] Suarez, S., Nassif, X., & Ferroni, A. « Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique ». Pathologie Biologie, V. 63, n° 1, (2015). 43-52.
- [164] Sakoui, S., Derdak, R., Addoum, B., Pop, O. L., Vodnar, D. C., Suharoschi, R., Soukri, A., and El Khalfi, B. "The first study of probiotic properties and biological activities of lactic acid bacteria isolated from Bat guano from Er-rachidia, Morocco". LWT, V. 159, (2022). 113224.
- [165] CLSI. "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing". 30th ed: CLSI Supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, (2020).
- [166] Jawan, R., Abbasiliasi, S., Mustafa, S., Kapri, M. R., Halim, M., and Ariff, A. B. "In Vitro Evaluation of Potential Probiotic Strain *Lactococcus lactis* Gh1 and Its Bacteriocin-Like Inhibitory Substances for Potential Use in the Food Industry". Probiotics and Antimicrobial Proteins, V. 13, n° 2, (2021). 422-440.
- [167] Colombo, M., Nero, L. A., and Todorov, S. D. "Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems". Brazilian Journal of Microbiology, V. 51, n° 2, (2020). 787-795.
- [168] Barbosa, J., Gibbs, P. A., and Teixeira, P. "Virulence factors among *Enterococci* isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal". Food Control, V. 21, n° 5, (2010). 651-656.
- [169] Sonei, A., Edalatian Dovom, M. R., and Yavarmanesh, M. "Evaluation of probiotic, safety, and technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from lighvan and koozeh cheeses". International Dairy Journal, V. 148, (2024). 105807.

- [170] Bover-Cid, S., and Holzapfel, W. H. "Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria". *International Journal of Food Microbiology*, V. 53, n° 1, (1999). 33-41.
- [171] Avaiyarasi, N. D., Ravindran, A. D., Venkatesh, P., and Arul, V. "*In vitro* selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk". *Food Control*, V. 69, (2016). 124-133.
- [172] Kim, K.-T., Yang, S. J., and Paik, H.-D. "Probiotic properties of novel probiotic *Levilactobacillus brevis* KU15147 isolated from radish kimchi and its antioxidant and immune-enhancing activities". *Food science and biotechnology*, V. 30, (2021). 257-265.
- [173] Dimitrakopoulou, M.-E., Stavrou, V., Kotsalou, C., and Vantarakis, A. "Boiling extraction method vs commercial kits for bacterial DNA isolation from food samples". *Journal of Food Science and Nutrition Research*, V. 3, n° 4, (2020). 311-319.
- [174] Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., and Goossens, H. "Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in *enterococci* and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*". *Journal of clinical microbiology*, V. 42, n° 10, (2004). 4473-4479.
- [175] Eaton, T. J., and Gasson, M. J. "Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates". *Applied and Environmental Microbiology*, V. 67, n° 4, (2001). 1628-1635.
- [176] Mansour, N. M., Heine, H., Abdou, S. M., Shenana, M. E., Zakaria, M. K., and El-Diwany, A. "Isolation of *Enterococcus faecium* NM113, *Enterococcus faecium* NM213 and *Lactobacillus casei* NM512 as novel probiotics with immunomodulatory properties". *Microbiology and Immunology*, V. 58, n° 10, (2014). 559-569.
- [177] Choeisoongnern, T., Sirilun, S., Waditee-Sirisattha, R., Pintha, K., Peerajan, S., and Chaiyasut, C. "Potential Probiotic *Enterococcus faecium* OV3-6 and Its Bioactive Peptide as Alternative Bio-Preservation". *Foods*, V. 10, n° 10, (2021). 2264.
- [178] Clark, N. C., Cooksey, R. C., Hill, B. C., Swenson, J. M., and Tenover, F. C. "Characterization of glycopeptide-resistant *enterococci* from U.S. hospitals". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, V. 37, n° 11, (1993). 2311-2317.
- [179] Bluma, A., and Ciprovica, I. "Diversity of lactic acid bacteria in raw milk" (2015).

- [180] Ouadghiri, M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Naser, S., Gevers, D., Lefebvre, K., Swings, J., and Amar, M. "Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk 'Iben'". *Journal of applied microbiology*, V. 106, n° 2, (2009). 486-495.
- [181] Garroni, E., Doulgeraki, A. I., Pavli, F., Spiteri, D., and Valdramidis, V. P. "Characterization of Indigenous Lactic Acid Bacteria in Cow Milk of the Maltese Islands: A Geographical and Seasonal Assessment". *Microorganisms*, V. 8, n° 6, (2020). 812.
- [182] Bouchibane, M., Zabouri, Y., Cheriguene, A., Kaced, A., Chougrani, F., and Saada, D. A. "Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry to Identify Lactic Acid Bacteria Isolated from Artisanal Dairy Products in Algeria". *Asian Journal of Dairy and Food Research*, V. 41, n° 4, (2022). 377-383.
- [183] Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., and Poznanski, E. "Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk". *International Dairy Journal*, V. 19, n° 1, (2009). 3-11.
- [184] Idbeis, H. I. "Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of Lactic Acid Bacteria Isolated from Cow Raw Milk in Al-Kut-Iraq". *Central Asian Journal of Medical and Natural Science*, V. 4, n° 5, (2023). 623-631.
- [185] Cavicchioli, V. Q., Dornellas, W. d. S., Perin, L. M., Pieri, F. A., Franco, B. D. G. d. M., Todorov, S. D., and Nero, L. A. "Genetic diversity and some aspects of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat milk". *Applied biochemistry and biotechnology*, V. 175, (2015). 2806-2822.
- [186] El-Ghaish, S., Khalifa, M., and Elmahdy, A. "Antimicrobial impact for *Lactococcus lactis subsp. lactis* A15 and *Enterococcus faecium* A15 isolated from some traditional Egyptian dairy products on some pathogenic bacteria". *Journal of Food Biochemistry*, V. 41, n° 1, (2017). e12279.
- [187] Akbar, A., Sadiq, M. B., Ali, I., Anwar, M., Muhammad, N., Muhammad, J., Shafee, M., Ullah, S., Gul, Z., and Qasim, S. "*Lactococcus lactis subsp. lactis* isolated from fermented milk products and its antimicrobial potential". *CyTA-Journal of Food*, V. 17, n° 1, (2019). 214-220.
- [188] Han, K., Park, S., Sathiyaseelan, A., and Wang, M. H. "Isolation and characterization of *Enterococcus faecium* from fermented Korean soybean paste with antibacterial effects". *Fermentation*, V. 9, n 8, (2023). 760.
- [189] Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., and Penna, A. L. B. "Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications". *Food Engineering Reviews*, V. 4 n° 2, (2012). 124-140.

- [190] Fernandes, A., and Jobby, R. "Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential clinical applications". *Applied biochemistry and biotechnology*, V. 194, n° 10, (2022). 4377-4399.
- [191] Tormo, H., Ali Haimoud Lekhal, D., and Roques, C. "Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk and effect of farming practices on the dominant species of lactic acid bacteria". *International Journal of Food Microbiology*, V. 210, (2015). 9-15.
- [192] Kadri, Z., Spitaels, F., Cnockaert, M., Amar, M., Joossens, M., and Vandamme, P. "The bacterial diversity of raw Moroccan camel milk". *International Journal of Food Microbiology*, V. 341, (2021). 109050.
- [193] Yerlikaya, O. "Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis ssp. lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains". *Journal of Dairy Science*, V. 102, n° 1, (2019). 124-134.
- [194] Vasiee, A., Mortazavi, S. A., Sankian, M., Yazdi, F. T., Mahmoudi, M., and Shahidi, F. "Antagonistic activity of recombinant *Lactococcus lactis* NZ1330 on the adhesion properties of *Escherichia coli* causing urinary tract infection". *Microbial Pathogenesis*, V. 133, (2019). 103547.
- [195] Plumed-Ferrer, C., Barberio, A., Franklin-Guild, R., Werner, B., McDonough, P., Bennett, J., Gioia, G., Rota, N., Welcome, F., Nydam, D. V., and Moroni, P. "Antimicrobial susceptibilities and random amplified polymorphic DNA-PCR fingerprint characterization of *Lactococcus lactis ssp. lactis* and *Lactococcus garvieae* isolated from bovine intramammary infections". *Journal of Dairy Science*, V. 98, n° 9, (2015). 6216-6225.
- [196] Komprda, T., Sládková, P., Petirová, E., Dohnal, V., and Burdychová, R. "Tyrosine- and histidine-decarboxylase positive lactic acid bacteria and *enterococci* in dry fermented sausages". *Meat Science*, V. 86, n° 3, (2010). 870-877.
- [197] Xiao, J., Chen, C., Fu, Z., Wang, S., and Luo, F. "Assessment of the Safety and Probiotic Properties of *Enterococcus faecium* B13 Isolated from Fermented Chili". *Microorganisms*, V. 12, n° 5, (2024). 994.
- [198] Pereira, W. A., Piazzentin, A. C. M., de Oliveira, R. C., Mendonça, C. M. N., Tabata, Y. A., Mendes, M. A., Fock, R. A., Makiyama, E. N., Corrêa, B., Vallejo, M., Villalobos, E. F., and de S. Oliveira, R. P. "Bacteriocinogenic probiotic bacteria isolated from an aquatic environment inhibit the growth of food and fish pathogens". *Scientific Reports*, V. 12, n° 1, (2022). 5530.
- [199] Kim, Y. B., Seo, H. J., Seo, K. W., Jeon, H. Y., Kim, D. K., Kim, S. W., Lim, S.-K., and Lee, Y. J. "Characteristics of High-Level Ciprofloxacin-Resistant *Enterococcus*

faecalis and *Enterococcus faecium* from Retail Chicken Meat in Korea. Journal of Food Protection, V. 81, n° 8, (2018). 1357-1363.

- [200] Valledor, S. J. D., Dioso, C. M., Bucheli, J. E. V., Park, Y. J., Suh, D. H., Jung, E. S., Kim, B., Holzapfel, W. H., and Todorov, S. D. “Characterization and safety evaluation of two beneficial, enterocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from kimchi, a Korean fermented cabbage”. Food microbiology, V. 102, (2022). 103886.
- [201] Baz, A. A., Hao, H., Lan, S., Li, Z., Liu, S., Chen, S., and Chu, Y. “Neutrophil extracellular traps in bacterial infections and evasion strategies”. Frontiers in Immunology, V. 15, (2024).
- [202] Additives, E. Panel o., Feed, P. o. S. u. i. A., Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. d. L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R. E., Wallace, R. J., Wester, P., Glandorf, B., Herman, L., Kärenlampi, S., Aguilera, J., Anguita, M., Brozzi, R., and Galobart, J. “Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms”. EFSA Journal, V. 16, (2018). e05206.
- [203] Tabanelli, G., Montanari, C., Bargossi, E., Lanciotti, R., Gatto, V., Felis, G., Torriani, S., and Gardini, F. “Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocin forming *lactococci*”. International Journal of Food Microbiology, V. 190, (2014). 14-23.
- [204] Avci, M., and Tuncer, B. Ö. “Safety evaluation of enterocin producer *Enterococcus* sp. strains isolated from traditional Turkish cheeses”. Polish Journal of Microbiology, V. 66, n° 2, (2017). 223.
- [205] Dilmi-Bouras, A., and Sadoun, D. « Survie des ferments du yaourt dans le tube digestif du lapin ». Le lait, V. 82, n° 2, (2002). 247-253.
- [206] Bs, S., Thankappan, B., Mahendran, R., Muthusamy, G., Femil selta, D. R., and Angayarkanni, J. “Evaluation of GABA Production and Probiotic Activities of *Enterococcus faecium* BS5”. Probiotics and Antimicrobial Proteins, V. 13, n° 4, (2021). 993-1004.
- [207] Suba, S., Vijayakumar, S., Nilavukkarasi, M., Vidhya, E., & Punitha, V. N. “Examining the probiotic, antibacterial, cholesterol-lowering, β -galactosidase and cytotoxicity impacts of *Lactococcus lactis* isolated from cow milk”. Vegetos, V. 36, n° 4, (2023). 1377-1383.

- [208] Mangiapane, E., Mazzoli, R., Pessione, A., Svensson, B., Riedel, K., and Pessione, E. "Ten years of subproteome investigations in lactic acid bacteria: A key for food starter and probiotic typing". *Journal of Proteomics*, V. 127, (2015). 332-339.
- [209] Zhang, Z., Zhou, Q., Ye, Z., Li, P., and Gu, Q. "Whole genome sequence analysis and *in vitro* probiotic characteristics of *Lactococcus lactis* ZFM559". *LWT*, V. 205, (2024). 116532.
- [210] Amenu, D., and Bacha, K. "Probiotic potential and safety analysis of lactic acid bacteria isolated from Ethiopian traditional fermented foods and beverages". *Annals of Microbiology*, V. 73, n° 1, (2023). 37.
- [211] Sylvere, N., Mustopa, A. Z., Budiarti, S., Meilina, L., Hertati, A., and Handayani, I. "Whole-genome sequence analysis and probiotic characteristics of *Lactococcus lactis Subsp. lactis* strain Lac3 isolated from traditional fermented buffalo milk (Dadih)". *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, V. 21, n° 1, (2023). 49.
- [212] Shivani, T. M., and Sathiavelu, M. "Probiotic evaluation, adherence capability and safety assessment of *Lactococcus lactis* strain isolated from an important herb "*Murraya koenigii*"". *Scientific Reports*, V. 14, n° 1, (2024). 15565.
- [213] Moussaid, S., El Alaoui, M. A., Ounine, K., Benali, A., Bouhlal, O., Rkhaila, A., Hami, H., and El Maadoudi, E. H. "*In-vitro* evaluation of the probiotic potential and the fermentation profile of *Pediococcus* and *Enterococcus* strains isolated from Moroccan camel milk". *Archives of Microbiology*, V. 205, n° 4, (2023). 144.
- [214] Rajput, K., Dubey, R. C., and Kumar, A. "Probiotic potential and immunomodulatory properties in *Enterococcus faecium* GMB24 and *Enterococcus hirae* SMB16 isolated from goat and sheep milk". *Archives of Microbiology*, V. 204, n° 10, (2022). 619.
- [215] Collado, M. C., Meriluoto, J., and Salminen, S. "Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains". *European Food Research and Technology*, V. 226, n° 5, (2008). 1065-1073.
- [216] Öztürk, H., Geniş, B., Tuncer, B. Ö., and Tuncer, Y. "*In vitro* probiotic properties of enterocin-producing *Enterococcus mundtii* and *Enterococcus faecium* strains isolated from sheep and goat colostrum". *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, V. 75, n° 1, (2024). 7099-7110.
- [217] Abdel Tawab, F. I., Abd Elkadr, M. H., Sultan, A. M., Hamed, E. O., El-Zayat, A. S., & Ahmed, M. N. "Probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from Egyptian fermented food". *Scientific Reports*, V. 13, n° 1, (2023). 16601.

- [218] Kouhi, F., Mirzaei, H., Nami, Y., Khandaghi, J., and Javadi, A. "Potential probiotic and safety characterisation of *enterococcus* bacteria isolated from indigenous fermented motal cheese". *International Dairy Journal*, V. 126, (2022). 105247.
- [219] Duprè, I., Zanetti, S., Schito, A. M., Fadda, G., and Sechi, L. A. "Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy)". *Journal of Medical Microbiology*, V. 52, n° 6, (2003). 491-498.
- [220] Holzapfel, W., Arini, A., Aeschbacher, M., Coppolecchia, R., and Pot, B. *Enterococcus faecium* SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics". *Beneficial microbes*, V 9, n° 3, (2018). 375-388.
- [221] Ohlsson, J. A., Johansson, M., Hansson, H., Abrahamson, A., Byberg, L., Smedman, A., Lindmark-Månsson, H., and Lundh, Å. "Lactose, glucose and galactose content in milk, fermented milk and lactose-free milk products". *International Dairy Journal*, V. 73, (2017). 151-154.
- [222] Lugani, Y., and Sooch, S. "Xylitol, an emerging prebiotic: a review". *Int J Appl Pharm Biol Res*, V. 2, (2017). 67-73.
- [223] Linares-Morales, J. R., Cuellar-Nevárez, G. E., Rivera-Chavira, B. E., Gutiérrez-Méndez, N., Pérez-Vega, S. B., and Nevárez-Moorillón, G. V. "Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fresh Fruits and Vegetables Based on Their Antimicrobial and Enzymatic Activities". *Foods*, V. 9, (2020). 1399.
- [224] Hayek, S. A., and Ibrahim, S. A. "Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review". *Food and Nutrition Sciences*, V. 4, (2013). 73-87.
- [225] Bourassa, L., and Butler-Wu, S. M. "Chapter 2 - MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification". In Sails, A., and Tang Y.-W. (Eds.), *Methods in Microbiology*, Academic Press. V. 42, (2015). 37-85.