

SOMMAIRE

Résumé.....	I
Abstract.....	II
الملخص.....	III
Abbreviations.....	IV
Liste des figures.....	V
Liste des tableaux.....	VI
Introduction	1
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	2
1. Cheptel et Travaux sur les bactéries lactiques en Algérie :	3
1.1. Cheptel carpin en Algérie :	3
1.1.1 Ethnologie des races et des populations caprines élevées en Algérie :	5
<i>Les populations locales</i>	5
<i>Les races améliorées</i>	6
<i>Individus issus de croisement</i>	6
1.2 Les recherches sur les bactéries lactiques en Algérie :	8
1.2.1 Isolement et identification des bactéries lactiques:	10
1.2.2 Caractères technologiques :	12
1.2.2 Etude des bactériocines et probiotiques :	14
1.2.3 Production de substances antifongiques par les bactéries lactiques :	17
1.2.4 L'Etude de l'antibiorésistance des bactéries lactiques :	17
1.2.5 Essai d'élaboration de ferments à l'échelle pilote pour la fabrication laitière:18	
1.2.6 Etude des ferments industriels utilisés en Algérie :	19
1.2.7 Etude de la diversité à l'intérieur de l'espèce:	21
2. Revue bibliographique sur les bactéries lactiques :	22
2.1 Caractéristiques générales :	22
2.2 Classification des bactéries lactiques :	24
2.3 <i>Streptococcus thermophilus</i> :	26
2.3.1 Taxonomie de <i>Streptococcus thermophilus</i> :	27
2.3.2 Caractéristiques du génome de <i>Streptococcus thermophilus</i> :	29
2.3.3 Le statut 'GRAS' de <i>Streptococcus thermophilus</i> :	31
2.3.4 Rôle de <i>Streptococcus thermophilus</i> dans la fabrication du yaourt :	31
2.4 Méthodes génétiques d'identification et de typage des bactéries lactiques :	33
2.4.1 Le ribotypage :	34

2.4.2	Le profil plasmidique :	35
2.4.3	Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP):	36
2.4.4	PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) et amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA):.....	36
2.4.5	Multi Locus Sequence Typing (MLTS) :	37
2.4.6	L'électrophorèse en champs pulsé (PFGE ; Puled Field Gel Electrophoresis) :.....	38
2.4.7	Random Amplified Polymorphic DNA (ou AP-PCR Arbitrarily Primed PCR):.....	43
2.4.8	Méthodes appliquées à l'étude de la diversité génétique des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> :	46
2.4.9	Evaluation des méthodes de typage :	47
2.5	Analyse et interprétation des résultats de typage par PFGE et RAPD-PCR :	48
2.5.1	Assistance informatique pour l'analyse des profils obtenus par les méthodes PFGE et RAPD-PCR :	48
2.5.2	Événements génétiques affectant les profils obtenus des méthodes PFGE et RAPD-PCR :	52
2.5.3	Congruence entre les résultats de deux méthodes de génotypage :	54
2.5.4	Multidimensional Scaling et Dendrogramme :	55
2.6	L'objective du travail :	56
MATERIEL ET MÉTHODES.....		58
1.	Les souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> utilisées et conditions de cultures :	59
2.	Typage moléculaire par Electrophorèse en Champ Pulsé (ECP) de <i>Streptococcus thermophilus</i> :.....	59
2.1	Préparation des blocs d'agarose :	60
2.1.1	Lyse des cellules à l'intérieur des inserts d'agarose (plug) :	61
2.1.2	Digestion de l'ADN avec les enzymes de restriction <i>SmaI</i> et <i>ApaI</i> :	61
2.2	Les conditions de migration :	62
2.3	Révélation du gel:.....	63
3.	Typage des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> par RAPD-PCR	64
3.1	L'extraction de l'ADN :	64
3.2	Optimisation de la méthode RAPD-PCR :	65
3.3	L'amplification de l'ADN par PCR:	66
4.	Analyse des profils des souches obtenus par PFGE et RAPD-PCR :	67
4.1	Réalisation des dendrogrammes :	68
4.2	Calcul de l'indice de diversité de Simpson :	69

4.3	Calcul de l'indice Ajusté de Rand (Adjusted Rand index) et l'indice de Wallace:....	69
4.4	Application de la Méthode MDS :.....	70
	RÉSULTATS ET DISCUSSION	71
1.	Reproductibilité des deux méthodes PFGE et RAPD-PCR :.....	72
1.1	Reproductibilité de la méthode RAPD-PCR avec les trois amorces XD9, M13 et OPI-02MOD :.....	73
1.1.1	Optimisation du protocole de la RAPD-PCR avec l'amorce OPI-02 MOD: ..	73
1.1.2	Optimisation du protocole de la RAPD-PCR avec l'amorce XD9	75
1.1.3	Optimisation du protocole de la RAPD-PCR avec l'amorce M13	76
1.1.4	Reproductibilité des profils RAPD-PCR résultants :.....	77
1.2	Reproductibilité de la méthode PFGE avec les deux enzymes de restrictions <i>SmaI</i> et <i>ApaI</i> :.....	82
1.2.1	Optimisation du résultat des profils PFGE obtenus :.....	83
2.	Pouvoir discriminant des deux méthodes PFGE et RAPD-PCR :.....	85
2.1	Discrimination et typabilité des souches de <i>St. thermophilus</i> par PFGE :.....	85
2.2	Discrimination et typabilité des souches de <i>St. thermophilus</i> par RAPD-PCR :.....	88
3.	Interprétation des résultats des dendrogrammes :.....	100
3.1	L'application des critères de Tenover <i>et al.</i> (1995):.....	100
3.2	Clusters (ou groupes) produits de la totalité du dendrogramme :.....	104
3.3	Congruence entre les Résultats de la PFGE et la RAPD-PCR via l'indice Ajusté de Rand et l'indice de Wallace :.....	105
3.3.1	Interprétation des résultats des dendrogrammes en incluant l'amorce XD9 : 109	
4.	Analyse des résultats par la méthode MDS:.....	112
5.	Conclusion:.....	116
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	119
	ANNEXE	142
	ARTICLES RELATIVES À LATHÈSE	145

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier vivement ;

Le Professeur Kihal Mebrouk, Directeur du laboratoire de Microbiologie Appliquée, à l'Université d'Oran, Es-Senia, pour son encadrement et son soutien.

La Professeur Candan Gurakan, de Middle East Technical University, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour son Co-encadrement.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail; Le Président, Professeur Henni Jamal Eddine de l'université d'Oran, Es-Senia, le Professeur Abdelwahad Djamel Eddine, de l'université de Tlemcen, le Professeur Abbouni Bouziane de l'Université de Sidi Bel Abbès et Docteur Benmechernene Zineb, maitre de conférences, à l'université d'Oran, Es-Senia.

Je n'oublie pas d'exprimer ma reconnaissance aux Docteur Yesim Soyer, Docteur Dilek Avsaroglu et Professeur Jorge Barros Velazquez et tous ceux qui m'ont aidé.

DEDICACE

**A mes Parents, A mes Frères, A la mémoire de Tata, A ma famille et
mes Amis.**

RÉSUMÉ

Dans la première partie de cette thèse les travaux de recherches réalisés sur les bactéries lactiques, en Algérie, ont été exposés. L'identification, en particulier des souches à l'intérieur de l'espèce est indispensable à tous ces thèmes abordés. Les méthodes moléculaires telles que la SDS-PAGE, la RAPD-PCR et la PFGE sont d'usage pour le typage moléculaire des souches de bactéries lactiques. La SDS-PAGE peut ne pas distinguer les sous espèces très proches phylogénétiquement. La PFGE et RAPD-PCR sont d'usage dans l'identification intra-spécifique. La fiabilité de ces deux méthodes dans l'identification des souches de *Streptococcus thermophilus* a été traitée. Trois amorces (XD9, M13 et OPI-02 MOD) et deux enzymes de restrictions (*SmaI*, *ApaI*) ont été testés. La reproductibilité, la typabilité, le pouvoir discriminant et la congruence entre les deux méthodes ont été examinées. Afin d'optimiser la méthode RAPD-PCR différentes concentrations d'amorces, d'ADN et d'enzyme Taq DNA polymérase ont été testées. Le Ratio Amorce/ADN a été ajusté. La reproductibilité a été vérifiée en différents jours et cinq mois plus tard. Il en a résulté que la meilleure reproductibilité a été obtenue avec l'amorce OPI-02 MOD et la pire avec l'amorce XD9 qui a été donc exclue de la suite de l'étude. Les résultats ont été exprimés en construisant des dendrogrammes par la méthode UPGMA. La valeur d'indice de diversité (DI) la plus élevée a été avec l'enzyme *SmaI* et la plus faible avec l'amorce M13. La combinaison numérique des résultats des deux amorces et des deux enzymes de restrictions a produit des valeurs d'indice de diversité et de congruence supérieure. Le résultat de la PFGE (*SmaI*, *ApaI*) a pu prédire les types de la RAPD (OPI-02 MOD, M13) avec une valeur d'indice de Wallace de 0.805. D'autre part, l'application des critères de Tenover et collaborateurs a montré une faible corrélation entre les deux méthodes. L'usage de la technique Multidimensional scaling a confirmé le résultat de la méthode UPGMA.

MOTS CLÉS :

Identification intra-spécifique, *St. thermophilus*, RAPD-PCR, optimisation, PFGE, reproductibilité, pouvoir discriminant, congruence, UPGMA, MDS.

ABSTRACT

Research topics carried out on Lactic acid bacteria, in Algerian laboratories, were presented in the first part of this dissertation. Identification at strain level of lactic acid bacteria has a great importance. Molecular methods of SDS-PAGE, RAPD-PCR and PFGE are used for such purpose. SDS-PAGE could not be able to distinguish between subspecies phylogenetically very close. PFGE and RAPD-PCR are used for typing strains within a species. The efficiency of these last two methods for the identification of *Streptococcus thermophilus* strains was studied. The study was carried out with three primers XD9, M13 and OPI-02 MOD and two restriction enzymes *SmaI* and *ApaI*. The typeability, reproducibility, discriminatory power and congruence were studied for both methods. Different concentrations of primer, DNA template and Taq DNA polymerase were tested to optimize the RAPD-PCR result. The Ratio of primer/ DNA was adjusted. The three primers yielded reproducible profiles on several days. Five months later, repeating RAPD-PCR experiment with XD9 primer was not reproducible. Therefore, this primer was excluded from the study. OPI-02 MOD showed the best reproducibility. For each experiment's result, a dendrogram was built by using UPGMA method. The highest discriminatory indice was yielded with *SmaI* enzyme and the lowest one was with M13 primer. The numerical combination of primers (M13 and OPI-02MOD) results and restriction enzymes (*SmaI* and *ApaI*) results increased the discrimination and the congruence of both methods. PFGE (*SmaI*, *ApaI*) result could predict RAPD (OPI-02 MOD, M13) types with Wallace's index of 0.805. However, when applying Tenover *et al.* criteria, a poor correlation has been noticed. Analysis using Multidimensional dimensional scaling method corroborated UPGMA results.

KEYWORDS : Intraspecific identification, *St. thermophilus*, RAPD-PCR, optimization, PFGE, reproducibility, discriminatory power, congruence, UPGMA, MDS

الملخص:

في الجزء الأول من هذه المذكرة تم التعرض للأبحاث الجارية في الجزائر حول بكتريا حمض اللبن. التعرف على السلالات سيما داخل نوع بكتيريات حمض اللبن أمر ضروري لجميع هذه المواضيع المتناولة. الطرق الجزيئية مثل PAGE-SDS ، RAPD-PCR و PFGE مستعملة في هذا المجال. قد لا تستطيع PAGE-SDS التمييز بين سلالات قريبة فيلوجينيا. تستخدم PFGE و RAPD-PCR في التعرف على السلالات داخل النوع. تمت دراسة فعالية هاتين الطريقتين في حالة *Streptococcus thermophilus*. تم اختبار ثلاثة بريمرات (XD9 ، M13 و OPI-02 MOD) و انزيمين (*SmaI* و *ApaI*). تم فحص الاستنساخ ، *typabilité* ، قوة التمايز و التطابق بين الطريقتين. لتحسين نتائج طريقة RAPD-PCR، تركيزات مختلفة للبريمرات، إنزيم Taq DNA polymérase و DNA تم اختبارها. تم دراسة نسبة بريمر / الحمض النووي. تم فحص نتائج الاستنساخ في أيام مختلفة و بعد خمسة أشهر. أفضل نتائج استنساخ تم الحصول عليها مع OPI-02 MOD والأسوأ مع XD9 و بالتالي تم استبعاده من الدراسة. النتائج تم تجسيدها على شكل Dendrogram باستعمال طريقة UPGMA. أعلى قيمة مؤشر التنوع (DI) تم الحصول عليها مع انزيم *SmaI* و أدناها مع M13. الجمع العددي (numerical combination) لنتائج PFGE مع *ApaI* و *SmaI* و لنتائج PCR-RAPD مع OPI-02MOD و M13 أظهر ارتفاعا في معاملات التنوع المحصل عليها وكذا انسجام النتائج بين الطريقتين. من جهة أخرى تطبيق معايير Tenover أظهر انسجاما ضعيفا بين نتائج التجريبتين. استعمال طريقة MDS

عزز النتائج المحصل عليها بطريقة UPGMA.

الكلمات المفتاحية:

التمييز بين سلالات داخل النوع البكتيري، *Streptococcus thermophilus*، RAPD-PCR ، تحسين، PFGE ، استنساخ، قوة التمايز، التطابق بين الطريقتين ، MDS ، UPGMA.

ABRÉVIATIONS

BL : Bactéries lactiques.

dNTP : Désoxyribonucléotides Triphosphate

DO: Densité Optique

LMG: Laboratoire de Microbiologie de Gand

LMA : Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Université d'Oran, Es-Senia.

MDS: Multidimensional Scaling

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

St.: *Streptococcus*

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

UPMGA: Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages.

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
1	La chèvre Arabia des régions d'El-Bayadh, Saïda (A gauche) et Biskra (A droite) (Badis, 2004).	7
2	La chèvre Arabia de la région de Djelfa (Badis, 2004).	7
3	La chèvre Makatia des régions de Ouargla et Ghardaïa (Badis, 2004)	7
4	La chèvre Makatia de la région d'Adrar (A gauche) et de de Tamanrasset (A droite) (Badis, 2004)	8
5	La chèvre Kabyle (grande Kabylie) (Badis, 2004).	8
6	Distances phylogénétiques entre les genres principaux constituant les BL basées sur les séquences des ARNr 16S (Stiles <i>et al.</i> , 1997)	26
7	Electron micrograph of <i>St. thermophilus</i> (Image de Micheline Rousseau ©INRA).	27
8	Représentation schématique de la répartition des gènes pour les 3 génomes de <i>St. thermophilus</i> (LMD-9, CNRZ1066 et LMG18311) (Lefébure et Stanhope, 2007).	30
9	L'électrophorèse en champ pulsé (A) mode opératoire (B) photo du gel.	39
10	Schéma représentative des appareils utilisés dans la méthode PFGE. (A) CHEF (B) FIGE.	41
11	amplification d'une séquence d'ADN par PCR.	44
12	Normalisation des profils de la méthode PFGE par le logiciel Gel compar II version 6.5.	49
13	Réalisation d'un dendogramme à partir des profils PFGE par le logiciel Gel compar II version 6.5.	51
14	Schéma présentant les modifications intervenant dans les profils de PFGE d'un isolat testé suite à des évènements génétiques variés.	53
15	Les profils des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> résultants de la RAPD-PCR avec 1µM de l'amorce OPI-02 MOD.	74
16	Les profils des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> résultants de la RAPD-PCR avec l'amorce XD9.	75
17	Les profils des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> résultants de la RAPD-PCR avec l'amorce M13.	76
18	Les profils des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> résultants de la	77

	RAPD-PCR avec 0.5 μ M et 1 μ M de l'amorce M13.	
19	Les profils des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> résultants de la RAPD-PCR avec l'amorce M13, générés cinq mois plus tard.	78
20	Les profils des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> résultants de la PFGE avec l'enzyme <i>SmaI</i> , La concentration de la protéinase K est de 500 μ g/ml, lors de l'extraction.	83
21	Les profils PFGE des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> avec l'enzyme <i>ApaI</i> et une durée d'incubation de 15h.	85
22	Les profils PFGE non typables des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> .	86
23	Les profils PFGE des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> obtenus avec l'enzyme <i>SmaI</i> .	87
24	Les profils PFGE des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> obtenus avec l'enzyme <i>ApaI</i> .	88
25	Les profils RAPD-PCR des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> obtenus avec l'amorce OPI-02 MOD.	89
26	Les profils RAPD-PCR des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> obtenus avec l'amorce M13.	89
27	Les profils RAPD-PCR des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> obtenus avec l'amorce XD9.	90
28	Dendrogramme du résultat de la PFGE avec l'enzyme <i>SmaI</i> .	93
29	Dendrogramme du résultat de la PFGE avec l'enzyme <i>ApaI</i> .	94
30	Dendrogramme combiné PFGE (<i>SmaI</i> , <i>ApaI</i>).	95
31	Dendrogramme du résultat de la RAPD-PCR avec l'amorce OPI-02MOD.	96
32	Dendrogramme du résultat de la RAPD-PCR avec l'amorce M13.	97
33	Dendrogramme combiné RAPD-PCR (OPI-02MOD, M13).	98
34	Dendrogramme combiné PFGE-RAPD-PCR (<i>SmaI</i> , <i>ApaI</i> , OPI-02MOD, M13).	99
35	Dendrogramme du résultat de la RAPD-PCR avec l'amorce XD9.	111
36	Représentation en deux dimensions obtenue par la technique MDS de la relation génétique entre les souches de <i>St. thermophilus</i> selon le résultat de la RAPD-PCR (M13).	113
37	Représentation en deux dimensions obtenue par la technique MDS de la relation génétique entre les souches de <i>St. thermophilus</i> selon le résultat de la RAPD-PCR (OPI-02 MOD, M13).	114
38	Représentation en deux dimensions obtenue par la technique MDS de la relation génétique entre les souches de <i>St. thermophilus</i> selon le résultat de la PFGE (<i>SmaI</i> , <i>ApaI</i>).	115
39	Représentation en deux dimensions obtenue par la technique MDS de la relation génétique entre les souches de <i>St. thermophilus</i> selon le résultat de la PFGE-RAPD-PCR (<i>SmaI</i> , <i>ApaI</i> , OPI-02MOD, M13).	116

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
1	Evolution des effectifs de cheptels exprimés en milliers de têtes (Nedjraoui, 2003; FAOdatabase February 2012)	3
2	Avantages et inconvénients des différentes techniques de génotypage (van Belkum 2001)	35
3	Données sur les souches de <i>St. thermophilus</i> utilisées dans cette étude.	59
4	Clusters obtenus, à des coefficients de similarité de Dice, selon les critères de Tenover <i>et al.</i> , à partir des dendrogrammes de PFGE et leurs équivalents pour les dendrogrammes de RAPD-PCR.	103
5	Les valeurs de l'indice Ajusté de Rand obtenues par la comparaison des deux méthodes PFGE et RAPD-PCR en appliquant les critères de Tenover <i>et al.</i> (1995).	106
6	Les valeurs de l'indice de Wallace obtenues par la comparaison des deux méthodes PFGE et RAPD-PCR en appliquant les critères de Tenover <i>et al.</i> (1995).	106
7	Les valeurs de l'indice Ajusté de Rand obtenues de la comparaison des Clusters produits de la totalité du dendrogramme, pour les deux méthodes PFGE et RAPD-PCR.	107
8	Les valeurs de l'indice de Wallace obtenues de la comparaison des Clusters produits de la totalité du dendrogramme, pour les deux méthodes PFGE et RAPD-PCR.	107

Introduction :

Depuis plus d'une vingtaine d'années, les bactéries lactiques font l'objet de recherche dans plusieurs laboratoires en Algérie. Nous avons essayé de présenter, dans la première partie de la synthèse bibliographique, les principaux axes qui ont été abordés. Ce qui pourrait constituer une contribution à la connaissance de la situation de la microflore lactique en Algérie. Les bactéries lactiques du lait de chèvre font, principalement, l'objet des recherches au niveau du laboratoire LMA (Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Université d'Oran, Es-Senia), avec un intérêt croissant porté sur le lait camelin, dernièrement. Tous les thèmes de recherche abordés (exposés ci-dessous) comme, l'identification des bactéries lactiques, la caractérisation des souches ayant des propriétés technologiques intéressantes, la caractérisation des souches probiotiques et productrices de bactériocines et enfin l'élaboration de ferments lactiques, nécessitent des méthodes fiables d'identification, notamment, celle des souches de bactéries lactiques à l'intérieur de l'espèce. Les méthodes moléculaires telles que la SDS-PAGE, la RAPD-PCR et la PFGE sont d'usage pour le typage moléculaire des souches de bactéries lactiques. Le typage des souches est important en raison de son application pour répertorier les souches autochtones et pour créer des banques de données de souches de bactéries lactiques. L'identification au niveau de la souche est aussi intéressante pour le processus de traçabilité des souches et le brevetage des souches étudiées. .

Cette thèse a porté sur l'application des méthodes génétiques la PFGE et la RAPD-PCR dans le typage et l'étude de la diversité génétique des souches de *Streptococcus thermophilus* (voir l'objective page 56). L'étude de la diversité génétique des bactéries lactiques par la SDS-PAGE a été aussi incluse (voir partie Articles relative à la thèse, page 145).

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Cheptel et Travaux sur les bactéries lactiques en Algérie :

Cette partie est consacrée aux différentes études réalisées sur le cheptel carpin et sur la microflore lactiques en Algérie.

1.1. Cheptel carpinen Algérie :

L'élevage, en Algérie, concerne principalement les ovins, les caprins, les bovins et les camelins. Les effectifs recensés durant les vingt dernières années sont représentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Evolution des effectifs de cheptels exprimés en milliers de têtes (Nedjraoui, 2003; FAOdatabase February 2012).

Années	1987	1990	1995	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2010
Bovins	1416	1 393	1 267	1 580	1 595	1 613	1 572	1 561	1 614	1 586	1 650
Ovins	16 148	17697	17302	17989	17616	17299	17588	17503	18293	18909	20 000
Caprins	2 568	2 472	2 780	3 062	3 027	3 129	3 281	3 325	3 451	3 590	3 800
Camelins	120	123	126	220	235	246	245	250	273	269	290
Total	20 252	21685	21475	22851	22473	22287	22686	22639	23631	24354	25740

Les ovins prédominent et représentent, en Algérie, 80% de l'effectif global avec plus de 10 millions de brebis. L'élevage caprin, représentant 13%, vient en seconde position, comprenant 50 % de chèvres. L'effectif des bovins reste faible avec un nombre de têtes de 1.6 - 1.7 million de têtes (6 % de l'effectif global) dont 58 % sont des vaches laitières. En Algérie il y a une spécialisation des zones agroécologiques en matière d'élevage. L'élevage bovin reste cantonné dans le Nord du pays avec quelques incursions dans les autres régions. Les parcours steppiques sont le domaine

de prédilection de l'élevage ovin et caprin avec plus de 90 % des effectifs qui y vivent entraînant une surexploitation de ces pâturages(Nedjraoui, 2003).

Le cheptel camelin représente 1.12% de l'effectif global. Il est répartie, surtout, dans les zones steppiques et dans les zones arides. Cette dernière décennie les éleveurs commencent à s'intéresser aux élevages camelins pour produire la viande et le lait. Le lait camelin attire les éleveurs par les capacités nutritives et thérapeutiques(Badis 2004).

En Algérie, la filière d'élevage caprin reste peu développée. Malgré cela l'effectif caprin a doublé en l'espace de dix ans(Moustaria, 2008). Le cheptel caprin a atteint, en 2008, un effectif de 3,8 millions de têtes dont 2,2 millions de chèvres et occupe la troisième place après l'ovin et le bovin (Kadi *et al.* 2013). La conduite du troupeau reste traditionnelle. Quoique, plusieurs programmes sont initiés présentement pour, d'une part, améliorer et organiser l'élevage caprin traditionnel et, d'autre part, l'intensifier (Feliachi, 2003). Les races caprines sont caractérisées généralement par une grande rusticité et sont adaptées aux conditions difficiles du milieu, ce qui permet de tirer profit de cet élevage dans les régions pauvres. De ce fait elles constituent un patrimoine génétique à sauvegarder. L'élevage caprin est réparti dans toutes les zones en Algérie. Au nord, il est cantonné aux zones montagneuses, mais le gros de l'effectif est réparti dans les zones steppiques, subdésertiques et les oasis des zones arides. Ces écosystèmes steppiques et ces régions arides, caractérisés par une grande fluctuation climatique qui se traduit par des années de sécheresse, limitant les possibilités d'augmentation des effectifs de cheptel reproducteurs (Moustaria, 2008). Le lait de chèvre, par sa valeur nutritionnelle et son aptitude à la transformation notamment en fromage de qualité, est très recherché (Park, 2012). Quant à la viande caprine, elle

véhicule l'image d'un produit biologique et constitue une source de protéines animales mais aussi de revenu pour les populations rurales surtout dans les pays en voie de développement (Escareño *et al.*, 2013).

1.1.1 Ethnologie des races et des populations caprines élevées en Algérie :

La composition raciale des populations du cheptel caprin est très hétérogène, comprend les chèvres locales et les chèvres de races améliorées, en plus des individus résultants des croisements. On peut les diviser en deux catégories, les populations locales et les races améliorées.

Les populations locales :

Le cheptel algérien est peu connu, sa conformation et ses aptitudes laitières sont mal définis. Il est représenté par une population Arabe-Maghrébine qui est dominante, connue sous le nom de population Nord Africaine (Badis, 2004).

La chèvre Arabe se rattache à la race Nubienne, elle se rencontre sur les hauts plateaux et les régions septentrionales du Sahara associés aux ovins (Fig. 1 ; Fig. 2). Sa taille atteint 0.70 m, la tête est dépourvue de cornes, la robe est polychrome et se présente fréquemment associés du blanc, du roux, du noir et du gris. Deux types, de chèvre Arabe, sont distingués :

- La chèvre Arabia de type sédentaire et transhumant
- La chèvre Makatia (Fig. 3).

L'Arabia présente un pelage à longues mèches noires surtout avec rouges briques ou crème avec des mèches grises et brunes, la tête est noire, les oreilles longues, tombantes, les pattes sont noires.

La Makatia a un pelage court, la robe est de couleurs diverses.

La chèvre Kabyle peuple abondamment les massifs montagneux de la Kabylie, l'Aurès et du Dahra. Elle est de petite taille, vive, indisciplinée, son poil est long, de couleur généralement brun foncé parfois noir. Sa tête de profil courbé est surmontée de cornes, porte des oreilles longues et tombantes, ses mamelles globuleuses à trayons divergents fournissent à la mise bas un litre de lait. La couleur de la robe est variable avec prédominance du blanc, le beige et le roux.

La chèvre de M'zab, dite aussi chèvre rouge des oasis, elle se retrouve surtout dans le sud. C'est une bonne laitière, la robe présente trois couleurs : le chamois dominant, le blanc et le noir. Le poil est long, les oreilles sont longues et tombantes.

Les races améliorées :

L'introduction des races améliorées en Algérie date depuis la période coloniale. Les principales races implantées sont : la race de Malte, la Taggenburg, la Saanen, l'Alpine, la race de Murcie et la race Chamia. Ces races n'ont pas donné les résultats escomptés vu les difficultés d'implantation (maîtrise technique insuffisante, manque de motivation et de moyens).

Individus issus de croisement :

Les croisements entre individus de races améliorés et des populations locales sont nombreux, c'est pourquoi le troupeau caprin algérien est composé d'individus peu ressemblants entre eux (Aspects extérieurs, capacité de production...).



Figure 1 : La chèvre Arabia des régions d'El-Bayadh, Saïda (A gauche) et Biskra (A droite)
(Badis, 2004).



Figure 2 : La chèvre Arabia de la région de Djelfa (Badis, 2004).



Figure 3 : La chèvre Makatiades régions de Ouargla et Ghardaia (Badis, 2004).

Clicours.COM



Figure 4 : La chèvre Makatia de la région d'Adrar (A gauche) et de de Tamanrass et (A droite) (Badis, 2004)



Figure 5: La chèvre Kabyle (grande Kabylie) (Badis, 2004).

1.2 Les recherches sur les bactéries lactiques en Algérie:

Les bactéries lactiques constituent un groupe de genres et d'espèces divers associés aux plantes, viandes, laits crus et produits laitiers (Carr *et al.*, 2002; Azadniaet *al.*, 2011).Elles comprennent les principaux genres suivants : *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Bifidobacterium*,

Propionibacterium, *Brevibacterium*(Mayer *et al.*, 1998 ; Carr *et al.*, 2002), *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Microbacterium* (Holzapfel *et al.*, 2001 ; Mohania *et al.*, 2008).

Les bactéries lactiques sont à la base de la fabrication des fromages, des yaourts, des laits fermentés et du kéfir. Selon les types de fromages considérés (Miettonet *al.*, 1994), la coagulation du lait est obtenue par les actions conjuguées des enzymes coagulantes et des bactéries lactiques (lactocoques essentiellement et/ou leuconostocs pour les fromages à pâte molle ou à pâte pressée ; streptocoques thermophiles et lactobacilles thermophiles pour les fromages à pâte pressée cuite). Le rôle principal de ces bactéries est l'abaissement du pH du lait ou des caillés, au dépend du lactose, selon des cinétiques spécifiques à chaque fabrication. En plus de ce rôle fondamental d'acidification responsable de la formation du gel puis du caillé, les bactéries lactiques interviennent dans la production des composés d'arôme ou de leurs précurseurs. Par exemple, dans les fromages frais, le diacétyle résulte du métabolisme du citrate. Par ailleurs, dans les fromages affinés, l'activité des enzymes protéolytiques des bactéries lactiques fondamentale, car elle complète l'action de la présure restant active dans le caillé, et celle de la plasmine. La protéolyse due aux bactéries lactiques va surtout conduire à des peptides courts et à des acides aminés libres. Ces derniers sont des précurseurs pour de nombreux produits d'arôme (Kihale *et al.*, 1996).

Le yaourt constitue un bon exemple de produit de grande consommation qui a connu un essor industriel sans précédent au cours des trois dernières décennies, dans tous les pays du monde. Cette fermentation lactique est due essentiellement à la culture associée de deux espèces *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. *bulgaricus*. La maîtrise de la croissance et des métabolismes de cette culture mixte que constitue le yaourt n'est pas sans poser différents problèmes de régularité des quantités finales des produits, car des interactions (stimulation ou inhibition) entre les espèces peuvent perturber la stabilité des équilibres bactériens (Badis, 2004 ; Guessas, 2007).

1.2.1 Isolement et identification des bactéries lactiques:

Le premier objectif d'une telle collecte est l'exploration de la diversité de la flore des bactéries lactiques dans les milieux étudiés. Ensuite, la sélection de souches performantes. Par conséquent, l'isolement et l'identification sont toujours suivis soit de tests de leurs caractères technologiques liés aux fermentations, ou bien, l'étude des propriétés probiotiques, surtout la production de bactériocines

La majorité des bactéries lactiques étudiées, ont été collectées de produits laitiers, comme, les laits crus de chèvres (Chekroune *et al.*, 1998; Badis, 2004 ; Guessas et Kihal, 2004 ; Badis *et al.*, 2005; Moulay *et al.*, 2006; Saidi *et al.*, 2007 ; Marroki *et al.*, 2011 ; Moulay *et al.*, 2013), les lait crus de vaches (Ghazi *et al.*, 2009 ; Koiche et Dilmi, 2010), les laits de chamelles (Saidi *et al.*, 2005, Ghazi *et al.*, 2009 ; Drici *et al.*, 2010 ; Merzouk *et al.*, 2013 ; Chentouf et Benmechernene, 2013), les laits de brebis (Kacem *et al.*, 2002 ; Zadi Karam et Karam, 2006) et le lait cru de jument (Bendimerad *et al.*, 2012). Les bactéries lactiques du Fromage de chèvres (Daoudi, 2006), du Fromage d'El-Klila séché, de Dhan (Idoui *et al.*, 2009 ; Guessas *et al.*, 2012) locaux ont été également identifiées. Des études, vraiment rares sur des bactéries lactiques isolées de fermentation d'olives vertes (Kacem *et al.*, 2004), de Sorgho ensilage (Chahrour *et al.*, 2013) d'intestin de poissons (Sahnouni *et al.*, 2012) et de pollen de miel d'abeille ont été aussi reportées (Belhadj *et al.*, 2010).

Djadouni et Kihal (2012) ont travaillé sur les bactéries lactiques issues du lait de chèvre de la région de Mascara et ils ont pu révéler des souches de *Lactobacillus plantarum* et de *Pediococcus* capables de synthétiser des bactériocines qui ont été mises en évidence au laboratoire.

Des souches de bifidobactéries obtenues des selles de nouveaux nés âgés (Bahloul *et al.*, 2012), ainsi que des lactobacilles du jabot et d'intestin de poulet (Behira et Kihal, 2011) ont été isolées et leur potentiel probiotique a été étudié.

L'identification de ces souches s'est faite, généralement, en se basant sur les caractères phénotypiques ; morphologiques, physiologiques, biochimiques et les profils de fermentation des carbohydrates. Les espèces qui ont été identifiées appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Weissella* et *Bifidobacterium*.

Le nombre de travaux ayant recouru à des méthodes de Biologie Moléculaire reste limité. Parmi les méthodes utilisées l'analyse des protéines. On peut citer par exemple La SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) et la méthode MALDI-TOF (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionisation, TOF, time-of-flight mass spectrometry). La méthode SDS-PAGE a permis de corroborer, de compléter et de corriger l'identification phénotypique des espèces de bactéries lactiques, isolées des laits crus de chèvre et de chamelle, et appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Enterococcus* (Ghazi *et al.*, 2009). Des coques résistants à 6.5 % de NaCl, ont donné le même profil protéique que l'espèce *Lactococcus lactis*, par l'usage de la SDS-PAGE (Zadi-Karam et Karam, 2006). La technique de MALDI-TOF couplée au séquençage au niveau de l'ADNr 16S a contribué à l'identification intra-spécifique de souches de

leuconostocs (provenant de lait de chamelle) et appartenant aux sous espèces *mesenteroides*, *dextranicum* et *cremoris* (Benmechernene *et al.*, résultats en cours de publication). L'identification phénotypique a été corrélée à l'identification génotypique, par le séquençage du gène codant pour l'ARN16S, dans le cas des souches de *Lactococcus lactis* et des espèces du genres *Lactobacillus* (Drici *et al.*, 2010 ; Marroki *et al.*, 2011). L'identification, des souches du genre *Enterococcus* et des sous-espèces *lactis/hordniae* du genre *Lactococcus*, a été réalisée par Rep-PCR (repetitive sequence-based PCR) combinée à la spécifique PCR (Bendimerad *et al.*, 2012)

1.2.2 Caractères technologiques :

Les travaux portant sur ce thème abordent les réactions métaboliques des bactéries lactiques qui interviennent dans l'élaboration de la qualité organoleptique des produits laitiers. Un dépistage, des bactéries lactiques montrant des performances particulières et recherchées, a été réalisé parmi les souches collectées.

Différent auteurs se sont appliqués à étudier les cinétiques de croissances et d'acidité, la détection de l'activité protéolytique sur un milieu gélosé additionné le plus souvent de lait écrémé (Ghazi, 2003 ; Moulay *et al.*, 2006 ; Hadadji et Bensoltane, 2006 ; Daoudi, 2006; Hassaine *et al.*, 2007 ; Bendimerad *et al.*, 2012), la détection de production d'exopolysaccharides sur milieux appropriés pour les leuconostocs et les lactobacilles (Ghazi, 2003; Badis *et al.*, 2005 ; Marroki *et al.*, 2011). L'activité protéolytique a été également détectée en mesurant l'activité aminopéptidasique des lactobacilles (Marroki *et al.*, 2011). La production du CO₂, qui joue un rôle dans la texture des produits laitiers, a été mesurée chez *Leuconostoc mesenteroides* en culture pure ou mixte avec *Lactococcus lactis* (Kihal *et al.*, 2007) grâce à une méthode

manométrique mise au point par Kihal *et al.* (2006). La cinétique de production de composé aromatique par le dosage de l'acétoine- diacétyle a montré un certains nombre de faits intéressants (Ghazi, 2003). Les résultats ont confirmé ce que des travaux précédents ont mentionnés, la production d'acétoine-diacétyle est concomitante à l'utilisation du citrate chez les *Lactococcus lactis*, à l'inverse des Leuconostocs, pour lesquelles la production est tardive et s'opère lorsque le pH du milieu est acide (Ghazi, 2003). Contrairement aux Leuconostocs, l'acétoine-diacétyle n'a pas été décelée pour les souches de *Weissella paramesenteroides* qui était pourtant Cit+. Deux hypothèses peuvent être émises soit une accumulation d'une concentration limitante d' α -acétolactate soit l'utilisation du citrate suit une autre voie métabolique (Ghazi, 2003).

Dans cette étude deux autres choses sont à retenir pour des souches isolées de laits de chamelles ; Le premier est que la plus forte concentration d'acétoine-diacétyle a été détectée chez la souche de *Lactobacillus plantarum*. La deuxième est que chez une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* Cit⁺, la destruction de l'acétoine-diacétyle donnant le 2-3 butane-diole semble être précoce. L'étude de la cinétique de production d'acétoine-diacétyle a montré que la dose maximale était atteinte au bout de 5h et au bout de 16h aucune trace n'était détectée. Par conséquent, malgré que d'après Drici *et al.* (2010) 85% des souches protéolytiques de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, isolées de lait de chamelle, étaient citrate positive, il semblerait que la réalisation d'une cinétique de synthèse d'acétoine-diacétyle soit nécessaire pour sélectionner les souches aptes à un usage en starters.

Des propriétés originales de lactocoques provenant de laits de chamelles ont été rapportées comme la résistance à 6.5% de NaCl (Zadi-Karam et Karam, 2006 ;

Drici *et al.* (2010) la thermotolérance à 50°C, la résistance à pH 9.6 et la mise en évidence d'un plasmide codant pour la fermentation du citrate dont la taille est différente de 8kb (Drici *et al.*, 2010). Ces résultats reflètent une diversité inconnue chez les souches de *Lactococcus* par rapport aux starters usuels (Drici *et al.*, 2010) et qui reste à explorer dans le cas *Lactococcus* et des autres bactéries lactiques des laits de chamelles. Le nombre d'études portant sur la caractérisation des bactéries lactiques du laits de chamelles sont faibles (Benmechernene *et al.*, 2013b) à travers le monde. Le laboratoire LMA y consacre une grande partie de ces recherches. Non seulement les bactéries lactiques contenues sont scrutées mais aussi des analyses physico-chimiques sont réalisées, entre autre l'analyse des profilesprotéique par SDS-PAGE du lait de chamelles (Saidi *et al.*, 2005 ; Merzouk *et al.*, 2013)

En général, les caractères technologiques sont codés par des plasmides. Il a été clairement démontré que le déterminant génétique du système de transport du citrate est codé par un plasmide chez *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Kihal *et al.*, 1996). Il a été suggéré que les caractères phénotypiques Ther+ (thermotolérance), Lac+ (fermentation du lactose), Cit+ (Fermentation du citrate) et PrtP+ (l'activité de la protéinase de surface cellulaire), de la souche de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* 9B, sont liés au moins à quatre plasmides indépendants (Drici *et al.*, 2010)

1.2.2 Etude des bactériocines et probiotiques :

Récemment, un intérêt croissant a été constaté pour l'usage, des bactéries lactiques productrices de bactériocines (ou de leurs extraits extracellulaires), comme cultures protectrices (ou des extraits antimicrobiens) des produits alimentaires peu

transformés. L'emploi d'un certain nombre de ces cultures productrices de bactériocines a été suggéré dans d'autres applications, comme dans les probiotiques, pour l'inhibition des biofilms dans l'industrie alimentaire ou comme co-adjuvants de stratégies thérapeutiques combinées à d'autres agents antimicrobiens dans les applications biomédicales (Djadouni et Kihal, 2012 ; Benmechernene *et al.*, 2013 a).

Un axe de recherche, qui consiste à détecter l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques contre les bactéries pathogènes, est traité par les membres du laboratoire de microbiologie appliquée. De ce fait, une attention particulière est portée sur les souches productrices de bactériocines.

Chez des bactéries lactiques, provenant de laits de chèvres, des substances de nature protéique inhibitrices de bactéries pathogènes ont été détectées. On peut citer les exemples suivants ; une souche de *Lactobacillus plantarum* anti *Staphylococcus aureus* (Boumehira *et al.*, 2011 ; Mami *et al.*, 2012), des souches de *Lactobacillus plantarum* agissant contre des souches de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* (Marroki *et al.*, 2011). une souche de *Lactobacillus rhamnosus* ayant une activité contre *Staphylococcus aureus* (Marroki *et al.*, 2011). Un *Lactobacillus plantarum* agissant contre *Escherichia coli* (Saidi *et al.*, 2011 ; Djadouni et Kihal, 2012).

Les interactions réalisées entre des bactéries lactiques isolées de laits de chèvre ont révélées un taux de 22.93% de cas d'inhibition de l'ensemble des paires testés. Une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LCL01 a, même, synthétisé une substance stable au chauffage, de nature protéique et ayant une activité bactéricide (Saidi *et al.* 2011).

Des souches de *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* et *Lactobacillus* sp. produisant des substances inhibitrices actives contre des bactéries à Gram+ et à Gram- ont été décelées (Boumehira *et al.*, 2011 ; Djadouni et Kihal , 2012 ; Djadouni et Kihal, 2013). Il en est de même pour des souches de *Leuconostoc mesenteroides* originaires de laits de chamelles (Chentouf et Benmechernene, 2013)

En dépit du fait que *Listeria monocytogenes* n'a pas été détectée dans un nombre d'échantillons de laits crus collectés dans le nord ouest Algérien, 94% des bactéries lactiques ont montré une certaine activité antagoniste, du à l'acide lactiques, contre une, deux ou trois des souches de *Listeria monocytogenes* (SV1/2a, SV4b et LO28) (Moussa-Boudjemâa *et al.*, 2004). Toutes les espèces du genre *Lactobacillus* testées et isolées de laits de chèvres étaient complètement inactives contre *Listeria monocytogenes* CECT 932 (Marroki *et al.*, 2011).

Par contre, deux souches de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (B7 et Z8), isolées de laits de chamelles, ont montré un pouvoir inhibiteur, sur *Listeria* spp., du à des substances de nature protéique. La bactériocine produite par la souche B7 a été identifiée comme étant la leucocine B par la PCR spécifique (Benmechernene *et al.*, 2013b).

La notion de starter probiotique, bénéfique pour la santé, a été prise en compte, dans la caractérisation des deux souches de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* (B7 et Z8) (Benmechernene *et al.*, 2013b). Leurs bactériocines ont été identifiées génétiquement. Elles ont montré une bonne activité antimicrobienne contre des bactéries pathogènes. Elles ont maintenu leur viabilité et même proliférées lors de l'exposition aux conditions du tractus gastro-intestinales tels que, des pH acides, des concentrations de sels biliaires et à l'activité des enzymes gastriques (pepsine et

trypsine). Leur aspect sûr et non nuisible a été mise en évidence par l'absence d'activité hémolytique et plus ou moins la non résistance aux antibiotiques testés. Les cinétiques de croissance des bactéries pathogènes indicatrices en culture pures et mixtes avec *Leuconostoc mesenteroides* ont été réalisées (Benmechernene *et al.*, 2013b).

L'espèce *Helicobacter pylori* est largement étudiée actuellement à cause de son implication dans la pathologie gastroduodénale. Deux études ont été retrouvées sur ce sujet sur internet. L'inhibition d' *Helicobacter pylori* par les souches de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium longum* a été constatée en utilisant la méthode de diffusion en gélose. Cette activité antibactérienne était due à la production d'acide lactique. Ce dernier a été détecté par l'analyse qualitative des acides organiques par la chromatographie sur couche mince (Allem *et al.*, 2007). La seconde étude a aussi émis la probabilité que l'effet inhibiteur de souches de *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* vis-à-vis d'*Helicobacter pylori*, a été engendré par l'acide lactique plutôt que par une bactériocine (Tabak et Bensoltane, 2012).

1.2.3 Production de substances antifongiques par les bactéries lactiques :

Une seule étude a évalué l'influence de différentes température, pH et composition du milieu sur la production des substances antifongiques par des souches de *Lactobacillus* (Laref *et al.*, 2013)

1.2.4 L'Etude de l'antibiorésistance des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont reconnues ayant un statut GRAS (généralement reconnu comme étant sûrs). L'utilisation des antibiotiques dans la production animale est

considérée comme la principale cause de l'antibiorésistance chez les bactéries. Cependant, le risque de transfert de cette résistance par le biais des bactéries lactiques, longtemps considérées comme étant bénéfiques pour la santé, n'est pas encore bien résolu.

La résistance aux antibiotiques chez des les espèces de *Lactobacillus*, isolées d'intestin et de jabot de volaille, a été remarquée par Behira et Kihal (2011).

Leksir (2012) a détecté la présence de résistance aux antibiotiques chez certaines bactéries de ferments lactiques importés utilisés dans la fabrication de produits laitiers en Algérie. Ce résultat a été déduit, en étudiant les cinétiques de croissance et d'acidité des bactéries lactiques en présence de concentration croissante d'antibiotiques et le calcul de la CMI.

La même constatation a été rapportée par Dalache *et al.* (2003) chez des bactéries lactiques isolées de lait de vache, chèvre, brebis et de chamelle. L'antibiorésistance a été estimée par la méthode de diffusion sur milieu solide (estimation du diamètre des zones d'inhibition) et la CMI a été aussi déterminée. Ceci pourrait constituer un danger potentiel pour la santé du consommateur avec risque de transfert des gènes de résistance à la flore digestive humaine ou aux germes pathogènes.

1.2.5 Essai d'élaboration de ferments à l'échelle pilote pour la fabrication laitière:

L'objectif final de tous les projets cités précédemment est la fabrication de produits laitiers et de ferments. Pourtant, il n'existe pas beaucoup de travaux sur ce sujet.

Une tentative a été faite pour l'usage d'une culture starter dans la fabrication artisanale de produits laitier en Algérie. Cette culture a été composée de deux souches

sélectionnées de *Lactobacillus plantarum* (LbMS16 et LbMS21) et une souche de *Lactobacillus rhamnosus* (LbMF25) (Marroki *et al.*, 2011).

L'élaboration d'un aliment lacté fermenté a été essayé par la combinaison entre *Lactobacillus acidophilus* ou *Streptococcus thermophilus* et un *bifidobacterium* (Chekroun *et al.*, 1998). La Préparation de levain et un essai de fabrication du fromage de chèvre a été mentionné par Daoudi (2006)

1.2.6 Etude des ferments industriels utilisés en Algérie :

Ce thème malgré son importance n'est pas abordé au niveau du laboratoire LMA. Il est, d'ailleurs, très peu traité au niveau des laboratoires de recherche en Algérie. Les ferments utilisés dans la fabrication des produits laitiers sont importés et des contrôles profonds sont nécessaires pour confirmer l'identification des souches et déterminer leur pouvoir technologique ainsi que leur contenant en phages tempérés qui pose de gros problèmes pour l'industrie laitière. Quoique des laboratoires de contrôle existent, mais l'industrie devrait solliciter une analyse des laboratoires universitaires de recherche neutres et spécialisés.

Il est arrivé qu'au cours de notre travail on tombe sur des lactobacilles de yaourts commercialisés n'appartenant pas à des *Lactobacillus bulgaricus*. Leksir (2012) a même détecté une certaine thermorésistance des bactéries lactiques dans les ferments importés et utilisés dans la fabrication de produits laitiers en Algérie.

Il ressort d'une enquête menée par Leksir (2012) les résultats suivants : Il est souvent difficile, voire impossible, de déceler les différences en termes de performance entre différentes marques de ferments importés et utilisés par les industriels algériens. Elle a également noté que les opérateurs industriels sont ouverts à la possibilité de

développement de nouveaux produits fermentés. D'autre part, les opinions recueillies des chercheurs par rapport au contexte actuel de l'industrie laitière nationale démontrent que la communauté scientifique, tel que rapporté par Leksir(2012) déplore principalement le manque de confiance et de dynamique de collaboration durable entre le secteur industriel et la recherche scientifique. Plusieurs contraintes structurelles contribuent à cette situation, notamment le cadre réglementaire rigide ayant trait à la recherche scientifique et le manque d'infrastructures adéquates pour les essais pilotes et validation de nouveaux ferments. Le manque de représentativité des scientifiques dans la filière lait représente une autre handicap qui, selon les répondants, tendrait à défavoriser la communication intersectorielle nécessaire pour l'élaboration de collaborations fructueuses et durables. Un autre concept principal qui ressort des résultats recueillis auprès des chercheurs est la nécessité de protéger et bien exploiter les ressources locales, notamment la biodiversité microbienne endémique, et de développer les compétences nationales en matière de technologie des fermentations microbiennes afin de réduire la dépendance des matières premières et savoir-faire importés et mieux maîtriser la chaîne de l'assurance qualité des produits laitiers.

Parmi les perspectives pour le développement de ferments lactiques locaux, Leksir (2012) a noté que les opinions des chercheurs sondés convergent sur le fait que le développement de tels produits est tributaire de plusieurs facteurs dont la disponibilité et la maîtrise des outils scientifiques et technologiques de caractérisation des souches (ex. élaboration de cartes génétiques, mise en place de banques de souches certifiées). D'où l'importance du sujet de notre thèse portant sur les méthodes de typage moléculaire des bactéries lactiques.

1.2.7 Etude de la diversité à l'intérieur de l'espèce:

La diversité génétique à l'intérieur des (sous) espèces de bactéries lactique a été étudiée par la méthode Rep-PCR (repetitive sequence-based PCR) (Bendimerad *et al.*, 2012). En utilisant la PFGE, 5 souches de lactocoques, provenant de lait de chamelle, ont été clairement séparées de lactocoques de références isolées de lait de vache. Deux pulsotypes, ont été déterminés, à des niveaux de coefficient de similarité de Dice de 80% et 90% (Drici *et al.*, 2010).

La MALDI-TOF (Maldi : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Tof : time-of-flight mass spectrometry) a permis une meilleure identification intra-spécifique parmi des sous espèces *mesenteroides*, *dextranicum* et *cremoris* du genre *Leuconostoc*, par rapport au séquençage du gène codant pour l'ARN16S (Benmechernene *et al.*, résultats non encore publiés).

Il a été rapporté que la méthode SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) des protéines totales, offre l'avantage d'avoir un bon niveau de résolution taxonomique au niveau de l'espèce et de la sous espèce. De ce fait, elle a été utilisée avec succès pour l'identification des bactéries lactiques (Samelis *et al.*, 1995 ; Sacilik *et al.*, 2000 ; Sanchez *et al.*, 2003).

L'identification phénotypique d'un ensemble de bactéries lactiques a été combinée à l'analyse des protéines cellulaires totales par SDS-PAGE. Les profils protéiques ont été interprétés par le calcul du coefficient de Jaccard (Ghazi *et al.*, 2009). Il en ressort les conclusions suivantes ;

La SDS-PAGE a pu distinguer entre les souches des genres *Leuconostoc* et *Weissella*, elle a séparée les espèces à l'intérieur du genre *Lactobacillus* et entre les genres *Pediococcus* et *Enterococcus*.

Une variabilité a pu être détectée chez des espèces, identifiées comme étant *Leuconostocmesenteroides* subsp. *dextranicum*, avec un coefficient de 78% entre les souches 43 (lait de chèvre) et L4 (souche de référence ENSBANA). Il en est de même pour les souches 6 (lait de chamelle) et 13 (lait de vache) identifié comme *Weissella paramesenteroides* avec un coefficient de 80.7%. Par contre un coefficient de 100% a été obtenu entre les deux souches 27 et 43 ayant des profils phénotypiques présentant de faibles différences. La probabilité a été émise qu'elles appartiennent à la même sous-espèce et que la SDS-PAGE a eu des difficultés à faire la distinction entre des sous espèces très proches phylogénétiquement.

Selon la littérature, les meilleures méthodes pour l'étude de la diversité et l'identification au niveau de la souche sont sans conteste les méthodes génétiques PFGE, RAPD-PCR traitées dans la seconde partie.

2. Revue bibliographique sur les bactéries lactiques :

2.1 Caractéristiques générales :

Les bactéries lactiques sont des microorganismes relativement hétérogènes d'un point de vue morphologique et physiologique. Leurs principales caractéristiques sont : d'être à Gram+, catalase-, immobiles, asporogènes, anaérobies mais aérotoles, dépourvues de cytochromes, ne possédant pas de nitrate réductase et produisant des quantités importantes d'acide lactique par fermentation des glucides (Axelsson, 1998 ; Vandamme *et al.*, 1996). Des exceptions à ces caractéristiques générales sont rencontrées puisque certaines espèces peuvent produire la catalase ou les cytochromes

dans des milieux contenant de l'hématine, la production de pseudocatalase par certains lactobacilles est aussi possible (Holzapfel *et al.*, 2001).

Toutes les bactéries lactiques ont un métabolisme fermentaire, en utilisant les glucides, elles peuvent produire soit de :

- l'acide lactique exclusivement (bactéries homolactiques strictes),

- l'acide lactique et de l'acide acétique (bactéries hétérolactiques facultatives),

- l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et de CO₂ (bactéries hétérolactiques strictes) (Mathot *et al.*, 1994 ; Vandamme *et al.*, 1996). Certaines espèces ou certaines souches peuvent en outre produire de l'acide formique ou de l'acide succinique (De Roissart et Luquet, 1994).

Les bactéries lactiques ont été, en premier isolé du lait et interviennent dans la fermentation d'une variété d'aliments comme la viande, le lait, les produits laitiers, les végétaux, les boissons alcoolisées et le pain (Carr *et al.*, 2002; O'sullivan *et al.*, 2002). Ce sont aussi des hôtes normaux du tractus intestinal (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus plantarum*), du vagin (*Lactobacillus crispatus*, *Bifidobacterium longum*) et de la cavité buccale (*Bifidobacterium longum*, *Streptococcus mutans*) (Mayer *et al.* 1998; Klaenhammer *et al.* 2005). Les bactéries lactiques préservent les aliments des dégradations microbiennes et des bactéries pathogènes, permettant une plus longue conservation des aliments. Leur effet antimicrobien est du principalement à la production d'acide lactique et des acides organiques. Elles produisent également de l'acétaldéhyde, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone et les polysaccharides qui peuvent aussi avoir un effet antimicrobien. Les BL sont considérées comme le

principal groupe de probiotiques. Elles ont aussi un rôle texturant et aromatisant (Mohania *et al.*, 2012)

2.2 Classification des bactéries lactiques :

En 1919 Orla-Jensen a distingué au sein des BL les genres suivants ; *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Tetracoccus*, et *Microbacterium* sur la base de leurs propriétés morphologiques et phénotypiques. Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base de la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (De Roissart et Luquet, 1994; Holzapfel *et al.*, 2001). Cependant, les études basées sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S ont montré que certains taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne concordent pas avec les relations phylogénétiques suggérées. Ainsi, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par des caractéristiques phénotypiques (Gevers, 2002).

Les approches moléculaires ou l'information génotypique, comme l'étude du pourcentage GC%, les propriétés électrophorétiques des gènes produits ou les études d'hybridation génétique ont révolutionné drastiquement la classification des bactéries lactiques et ont prouvé que les BL constituent un groupe très hétérogène. Le genre *Bifidobacterium*, par exemple, n'est plus classé parmi les BL, mais il est encore considéré comme une bactérie lactique par tradition, du fait de certaines de ses propriétés physiologiques et biochimiques similaires à ceux des BL et aussi parce qu'il partage, avec les BL, certaines niches écologiques communes comme le tractus gastro-intestinal (Mayer *et al.* 1998; Klein *et al.* 1998 ; Holzapfel *et al.*, 2001).

Bifidobacterium a un effet probiotique sur l'organisme et est utilisé dans les aliments (Vandamme *et al.*, 1996 ; Gevers 2002 ; Patrignani *et al.*, 2006)

Les bactéries sont divisées en deux sous groupes. Les Bactéries lactiques 'typiques' appartiennent au sous groupe Clostridium ayant un contenu GC au dessous de 55 mol%, comme Les genres *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. les genres *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* et *Brevibacterium* font parti du sous groupe de sactinomycètes avec un contenu GC au dessus de 55 mol%. T (Fig.6) (Mayeret *al.*, 1998 ; Carr *et al.*, 2002). Actuellement, grâce aux méthodes moléculaires, notamment au séquençage du 16S rRNA, les bactéries lactiques comportent en plus des genres précédemment cités les genres *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Microbacterium* (Holzapfel *et al.*, 2001 ; Mohania *et al.*, 2008).

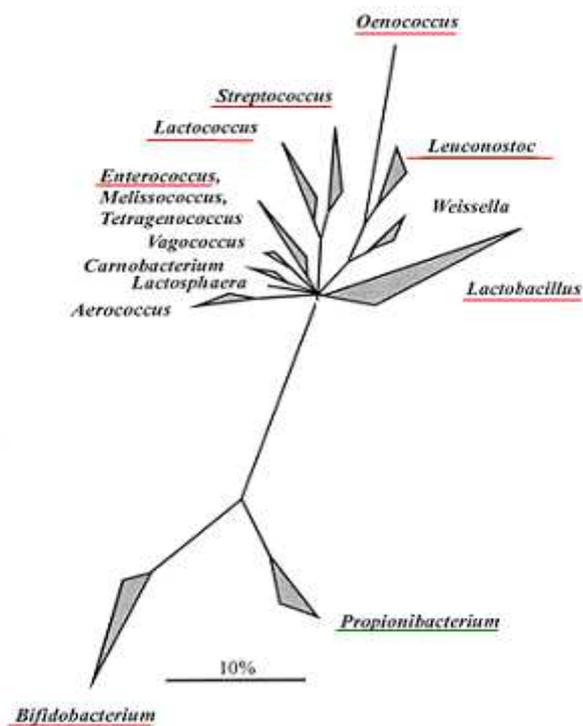


Figure 6: Distances phylogénétiques entre les genres principaux constituant les BL basées sur les séquences des ARNr 16S (Stiles *et al.*, 1997). La barre indique une divergence de séquence estimée de 10%. Les bactéries à bas G+C (en haut) sont phylogénétiquement éloignées des bactéries à haut G+C (en bas). Sont soulignés en rouge les genres pour lesquels la séquence d'au moins un génome est disponible, en vert ceux pour lesquels au moins un génome est en cours de séquençage.

2.3 *Streptococcus thermophilus* :

Streptococcus thermophilus est considérée comme la deuxième en importance après *Lactococcus lactis* parmi les bactéries lactiques utilisées en industrie. Environ 40 billion US\$ sont impliqués dans le commerce liée à *Streptococcus thermophilus* et plus de 10^{21} de cellules vivantes sont consommés, chaque année, par la population mondiale (Hols *et al.*, 2005; De Vuyst et Tsakalidou, 2008).

2.3.1 Taxonomie de *Streptococcus thermophilus* :

Le genre *Streptococcus* présente des cellules ovoïdes associées en chaîne (Fig. 7), incapable de croître à 10°C, pH 9,6 ou à 6,5% NaCl (Moschetti *et al.*, 1998). Le contenu en guanine plus cytosine est de, à peu près, 33mol% à 46mol% quoi que la majorité des valeurs reportées la détermine entre 35%-43mol% (Hardie et Whiley, 1997). L'identification de l'espèce *thermophilus* est basée sur l'hydrolyse de l'arginine et l'esculine, la fermentation de l'amygdalin, cellobiose, inuline, maltose, mannitol, raffinose N-acetylglucosamine et la capacité de croître à 45 °C (Moschetti *et al.*, 1998 ; Facklam, 2002).

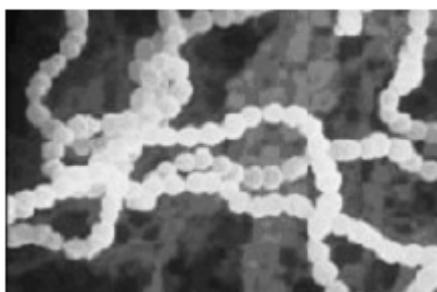


Figure 7: Electron micrograph of *St. thermophilus*

(Image de Micheline Rousseau ©INRA)

St. thermophilus est apparentée à *Lactococcus lactis* mais elle est phylogénétiquement plus proche des espèces du groupe viridans (Stile *et al.*, 1997; Delorme, 2008).

Le groupe des streptocoques viridans comporte majoritairement des espèces bactériennes pathogènes. Des études phylogénétiques basées sur l'analyse de la séquence ARN 16S ont distingué à son sein cinq groupes : mutans, anginosus, sanguinus, mitis, bovis et salivarius. Les espèces du groupe salivarius incluent *St. salivarius*, *St. vestibularis* et *St. thermophilus* (Kawamura *et al.*, 1995; Facklam, 2002). Les critères, selon le système de Lancefield, ont été également inclus dans la

détermination de ces groupes. Selon le système de Lancefield, 6 groupes (A, B, C, F, G et D) ont été identifiés au sein des streptocoques. Ce système est basé sur les différences immunologiques des polysaccharides de la paroi cellulaire (groupes A, B, C, F et G) ou des acides lipotechoïques (groupe D). Enfin, ces bactéries du genre *Streptococcus*, notamment celles des groupes A et B peuvent provoquer une variété de maladies (Cunningham, 2000).

Les trois espèces du groupe salivarius sont génétiquement proches, comme il a été démontré en comparant leur 16S RNA et leur genes *sodA* (Kawamura *et al.*, 1995; Poyart *et al.*, 1998). *Streptococcus thermophilus* a été classée, pendant certaines années, comme *Streptococcus salivarius* subspecies (*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*) (Farrow et Collins, 1984). Schleifer *et al.* (1991), en se basant sur l'hybridation ADN-ADN, ont confirmé le statut à part entière de l'espèce *Streptococcus thermophilus*.

Récemment, l'étude de la variation de la séquence des nucléotides de 8 gènes de ménage grâce à la technique MLST (Multilocus Sequence Typing), a démontré la pertinence du classement de *St. thermophilus* dans le sous-groupe *salivarius* ainsi que son statut d'espèce distincte (Delorme *et al.*, 2007).

La différenciation de *St. thermophilus* de *St. salivarius* ou d'*Enterococcus* spp, peut être une source de confusion dans son identification. L'amplification de la spacer region 16S-23S, l'amplification par RAPD-PCR et le séquençage du gene 16SrRNA permettent un typage moléculaire fiable pour l'identification de l'espèce (Moschetti *et al.*, 1998; Flint *et al.*, 1999; Langa *et al.*, 2003). La souche de *St. thermophilus* peut aussi être rapidement identifié en amplifiant par species-specific PCR based le fragment intragenic *sodA* gene (Poyart *et al.*, 1998).

Taxonomie de *Streptococcus thermophilus* selon De Vos *et al.*, (2009)

Règne : Bacteria

Division : Firmicutes

Classe : Coccus

Ordre : Lactobacillales

Famille : Streptococcaceae

Genre : Streptococcus

Espèce : *Streptococcus thermophilus*

Sous espèce : *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*

2.3.2 Caractéristiques du génome de *Streptococcus thermophilus* :

La séquence du génome de trois souches de *St. thermophilus* isolées du yaourt (CNRZ1066 et LMG18311) ou du fromage (LMD-9), est disponible dans les banques de données EMBL/GenBank (Bolotin *et al.*, 2004; Makarova *et al.*, 2006). La taille du génome de ces trois souches est comprise entre 1.8 Mb et 1.86 Mb.

La comparaison du génome entièrement séquencé des trois souches de *St. thermophilus* a révélé que 1487 séquences codantes sont homologues entre elles, soient 85% de leur génome (Fig. 8) (Lefébure et Stanhope, 2007). Dans une étude sur 47 souches de *St. thermophilus*, un cœur de génome composé de 1271 gènes a été établie pour cette espèce, soit seulement 58% de leurs génomes (Rasmussen *et al.*, 2008). Les différences essentielles détectées entre ces souches concernent les gènes impliqués dans la synthèse de bactériocines, les résistances aux phages, les traces de prophages, la biosynthèse d'exopolysaccharides, les pompes d'efflux et d'entrée et le métabolisme des peptides (Bolotin *et al.*, 2004; Deveau *et al.*, 2008; Horvath *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2008).

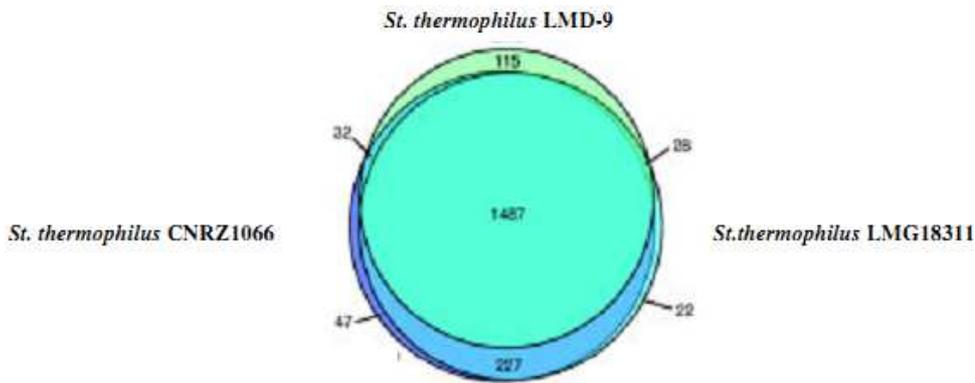


Figure 8 : Représentation schématique de la répartition des gènes pour les 3 génomes de *St. thermophilus* (LMD-9, CNRZ1066 et LMG18311)

(Lefébure et Stanhope, 2007).

Un postula ressort de l'étude du génome de *St. thermophilus*, selon lequel, une vaste évolution du génome c'est produite, du fait de l'usage de cette espèce, dans un environnement laitier, durant plusieurs millénaire (Bolotin *et al.*, 2004; Hols *et al.*, 2005). L'élaboration du génome de *St. thermophilus* c'est construite par l'inactivation et la perte d'un grand nombre de gènes surtout des gènes liés à la virulence, le transfert horizontal a participé à l'acquisition de nouveaux gènes et donc a contribué à son adaptation dans le lait (Bolotin *et al.*, 2004). Bien que relativement éloignées phylogénétiquement, mais de proximité écologique étroite, *St. thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, deux espèces impliquées dans la fabrication du yaourt, sont capables d'adhérer l'une sur l'autre ce qui pourrait faciliter le transfert horizontal entre elles (Tamine et Deeth, 1980; Bolotin *et al.*, 2004).

Comme exemple d'acquisition de gènes par transfert horizontal, l'ilôt génomique de 17 kb localisé au sein du gène *pepD* (gène tronqué codant pour une endopeptidase). Grâce à cet ilôt génomique, *St. thermophilus* a acquis notamment le gène *metC* impliqué dans la biosynthèse de la méthionine chez *Lactobacillus bulgaricus* (Bolotin

et al., 2004), acide aminé rare dans le lait et nécessaire à la croissance de *St.thermophilus* (Tamine et Deeth, 1980)

2.3.3 Le statut ‘GRAS’de *Streptococcus thermophilus* :

C’est le seul streptocoque du groupe viridans à être reconnu comme GRAS (Generally Recognised As Safe). La séquence complète du génome de trois souches de *St. thermophilus* (CNRZ1066, LMG18311, LMD-9) et leur analyse ont confirmé l’absence ou l’inactivation des gènes nécessaires à la virulence chez les streptocoques pathogènes (Bolotin *et al.*, 2004 ; Makarova *et al.*, 2006). De plus, le génome des 3 souches est dépourvu de gènes de résistancesaux antibiotiques comme propriété importante du pouvoir pathogène (Bolotin *et al.*, 2004; Hols *et al.*, 2005).

Des études récentes ont soulignées, la possibilité de transfert de gènes de résistance aux antibiotiques, de bactéries pathogènes au *Streptococcus thermophilus*, comme source d’inquiétude et l’importance du choix de souches sure, à utiliser dans les starters (Tosi *et al.*, 2007; Rizzotti *et al.*, 2009) .

2.3.4 Rôle de *Streptococcus thermophilus* dans la fabrication du yaourt :

Streptococcus thermophilus est très largement utilisée dans la fabrication de produits laitiers fermentés comme le yaourt, les fromages à pâte pressée cuite (Emmental, Gruyère, Parmigiano, Grana-types...etc), à pâte pressée (Cheddar) ou à pâte filée(Mozzarella) (Roissart et Luquet, 1994; Delorme, 2008). *St. thermophilus* a été récemment isolée de plantes en Bulgarie (Michaylova *et al.*, 2007).

L’un des rôles les plus importants de *St. thermophilus* dans la fermentation du lait, c’est qu’il permet une acidification rapide de celui-ci. Le taux d’acidification est

même une propriété dépendant de la souche (Marino *et al.*, 2003), de plus, elle peut aussi produire à de faible taux de formate, acétoine, diacetyl, acetaldehyde et acetate (Ott *et al.*,2000). D'autre part, les études ont caractérisé plusieurs bactériocines produites par *St. thermophilus* et des propriétés probiotiques propres chez celle-ci (Delmore, 2008).

La fabrication du yaourt repose sur les interactions prenant place entre *St. thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. L'association entre ces deux espèces est appelée proto-coopération car elle est bénéfique mais pas indispensable à la croissance de chaque espèce dans le lait (Tamine et Robinson,1999). *St. thermophilus* stimule la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* par laproduction de certains métabolites comme l'acide formique, le CO₂, l'acide pyruvique et l'acide folique (Higashio *et al.*, 1978 ; Rao *et al.*, 1984 ; Spinnler *et al.*,1987 ; Juillard *et al.*,1988 ; El-Abbassy *et al.*, 1993 ; Monnet *et al.*, 2005)

Lactobacillus bulgaricus présente une activité protéolytique plus élevée que celle de *St. thermophilus*,qui lui permet de libérer des acides aminés comme la valine, qui stimulent la croissance de *St. thermophilus* (Accolas, 1971 ; Courtin *et al.*, 2004 ; Courtin *et al.*, 2002). *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisent des exopolysaccharides, propriété qui leur permet en tant que starters dans la fabrication des yaourts, d'améliorer sa texture et d'éviter la synérèse et d'augmenter la viscosité des produits finis (Amatayakul *et al.*, 2006 ; Durlu-Özkaya *et al.*, 2007)

2.4 Méthodes génétiques d'identification et de typage des bactéries lactiques :

L'approche classique de la taxonomie des bactéries lactiques a été basée sur les caractéristiques phénotypiques comme par exemple ; leur morphologie, mode de fermentation de glucose, configuration de l'acide lactique, fermentation d'une variété de carbohydrates, analyse des protéines totales de la cellule et autres caractéristiques de la cellule (Holzapfel *et al.*, 2001 ; Temmerman *et al.*, 2004 ; Mohania *et al.*, 2008). Malheureusement, les méthodes phénotypiques ne sont pas complètement fiables et ont des limites, comme leur mauvaise reproductibilité et leur mauvais pouvoir discriminant. Les méthodes phénotypiques se basent sur les caractères exprimés par les microorganismes et s'intéressent par conséquent aux phénomènes post-traductionnels alors que les méthodes moléculaires s'intéressent au contenu de la cellule bactérienne, que ce soit du matériel protéique ou du matériel génomique.

Un autre désavantage des méthodes phénotypiques, c'est qu'elles n'expriment jamais la totalité de l'information potentiellement contenue dans le génome. l'expression du gène est directement lié aux conditions de l'environnement, entre autre, les conditions de culture au laboratoire (Mohania *et al.*, 2008).

Par contre, les techniques génétiques basées sur l'analyse de l'ADN permettent une meilleure différenciation des micro-organismes à différents niveaux, allant du genre jusqu'à la souche (le clone). L'avantage majeur des méthodes de typage basées sur l'étude de l'ADN (génotypage) est leur pouvoir discriminant. Des souches proches, ayant des caractères phénotypiques identiques peuvent être différenciées d'une façon fiable (Mohania *et al.*, 2008), par conséquent, elles permettent une excellente étude de la diversité au niveau de la souche. Ce qui, en plus du problème de reproductibilité,

explique que les techniques de génotypage prennent une part croissante par rapport aux techniques de phénotypage. L'accélération du développement du génotypage a aussi pour origine la disponibilité des données de séquençage des génomes complets qui ouvre la voie à une étude plus exhaustive des marqueurs polymorphes. Toutefois, il existe quelques limites (Vandamme *et al.*, 1996 ; Rossello-Mora et Amann, 2001). A titre d'exemples certaines espèces qui sont différentes peuvent avoir les mêmes séquences de l'ADNr 16S (Fox *et al.*, 1992). Il y a aussi le fait que les différentes techniques de génotypage n'ont pas toutes les mêmes performances dans l'évaluation de la diversité génétique. Les différences au niveau de la reproductibilité selon la spécificité de la technique choisie sont à mentionner. Les avantages et les inconvénients de ces méthodes, en général, sont résumés dans le tableau 2.

Ci-dessous, un aperçu des techniques génotypiques les plus importantes utilisées pour l'identification et le typage des bactéries lactiques.

2.4.1 Le ribotypage :

Il s'agit de la reconnaissance par des amorces nucléiques de gènes ribosomiaux. En pratique, l'ADN chromosomique est digéré par des enzymes de restriction. Les profils de restriction sont créés par hybridation avec des amorces 23S et/ ou 16S rRNA (Mohana *et al.*, 2008). Le pouvoir discriminatoire de la méthode dépend du nombre et du type de sondes d'oligonucléotides et enzymes de restriction utilisées. La méthode de ribotypage montre un pouvoir discriminant élevé au niveau de l'espèce plutôt qu'au niveau de la souche (Mohana *et al.*, 2008).

Tableau 2: Avantages et inconvénients des différentes techniques de génotypage (van Belkum 2001)

Méthode de typage	Typabilité	Reproductibilité	Pouvoir discriminant	Facilité de mise en oeuvre	Facilité d'interprétation	Accessibilité de la méthode	Coût
PFGE	Excellente	Bonne	Excellent	Bonne	Bonne	Variable	Elevé
RAPD/AP-PCR	Excellente	Faible	faible	Bonne	Faible	Bonne	Moyen
AFLP	Excellente	Bonne	Excellent	Bonne	Passable	Faible	Elevé
RFLP	Excellente	variable	variable	Bonne	Passable	Variable	Moyen
Ribotypage automatisé	Excellente	Excellente	Bon	Bonne	Bonne	Variable	Elevé
MLST (séquençage)	Optimale	Excellente	Excellent	Bonne	Excellente	Faible	Elevé

2.4.2 Le profil plasmidique :

Cette méthode utilise la variation du nombre et de la taille des plasmides hébergés par des souches de la même espèce, pour typer les bactéries lactiques car la plupart des souches de ce groupe semblent contenir plusieurs plasmides (Dykes et von Holy, 1994 ; Holzapfel *et al.*, 2001). Cependant, d'une part, cette méthode de typage est affectée par la capacité des souches à perdre ou à gagner des plasmides. D'autre part, Il a été observé que les souches de *St. thermophilus* possèdent peu de plasmides et que lorsque ceux-ci sont présents, ils sont en faible nombre de copies (Janzen *et al.*, 1992). La souche de *St.thermophilus* LMD-9 héberge des plasmides qui sont en faible nombre de copies (un à deux) (Makarova *et al.*, 2006). Par conséquent cette méthode n'est pas applicable à l'étude de la diversité génétique des souches de *St. thermophilus*.

2.4.3 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP):

Cette technique est réalisée en trois étapes : (1) la digestion de l'ADN génomique par une enzyme de restriction et la ligation d'adaptateurs aux fragments générés. (2) l'amplification sélective de fragments de restriction. (3) une séparation électrophorétique des fragments amplifiés. L'amplification des fragments de restriction est réalisée à l'aide d'amorces qui s'hybrident au niveau des adaptateurs du site de restriction. On amplifie en général de 50 à 100 fragments qui seront ensuite détectés sur gel de polyacrylamide (Vos, 1995). Cette technique a été signalée comme l'un des outils les plus reproductibles permettant de discriminer au niveau de l'espèce et au niveau de la souche (Janssen *et al.*, 1996). Cependant, comparé à PFGE, sa facilité d'interprétation est passable et son accessibilité est faible (Tab.2)

2.4.4 PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) et amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA):

La méthode PCR-RFLP implique l'amplification d'une région spécifique suivie d'une digestion par une enzyme de restriction (Giraffa *et al.*, 2003). Si l'amplification porte sur le gène rRNA, la méthode est appelée ARDRA. Les profils ARDRA sont plus reproductibles que ceux de PCR-RFLP et en plus comparable entre laboratoires.

La méthode PCR-RFLP a été utilisée avec succès dans l'identification des bactéries lactiques (Rodas *et al.*, 2003 ; Claisse *et al.*, 2007). Cependant, elle a seulement augmenté la fiabilité de l'identification des bactéries lactiques du Kéfir, au niveau de la souche, en confirmant le regroupement qui a été déjà obtenu par l'étude phénotypique (Mainville *et al.*, 2007)

Le génotypage de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus delbrueckii* par la méthode ARDRA a permis à Giraffa *et al.*, (1998) de les différencier au niveau de l'espèce et non pas au niveau de la souche.

2.4.5 Multi Locus Sequence Typing (MLST) :

La méthode peut être utilisée pour déterminer l'espèce, la sous espèce et la souche. Elle a été développée, au départ, pour caractériser la bactérie pathogène *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998), puis elle a été appliquée aux bactéries pathogènes comme *Streptococcus pneumoniae*, les espèces de *Yersinia*, *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori* (Maiden, 2006). Récemment, la méthode MLST, a été utilisée comme une nouvelle approche pour l'étude des bactéries lactiques comme, *Lactobacillus sanfranciscensis* (Picozzi *et al.*, 2010), *Oenococcus oeni* (De las Rivas *et al.*, 2004; Bilhère *et al.*, 2009), *Lactobacillus casei* (Cai *et al.*, 2007; Diancourt *et al.*, 2007), *Lactobacillus plantarum* (De las Rivas *et al.*, 2006; Tanganurat *et al.*, 2009), *Leuconostoc*, *Lactococcus* et *Pediococcus* (Gil-Lamaignere *et al.*, 2003 ; De las Rivas *et al.*, 2006) et *Streptococcus thermophilus* (Bolotin *et al.*, 2004 ; Hols *et al.*, 2005).

En général 1 à 7 gènes sont séquencés par isolat. Ensuite les séquences sont comparées aux séquences déjà rencontrées et les isolats classés en types de séquences (ST pour « sequencetypes ») (Gevers *et al.*, 2005). Dans l'analyse MLST, chaque gène est désigné comme locus. Chaque séquence différente correspond à un allèle distinct du gène. Environ 30 allèles par locus sont décrits. Chaque souche est caractérisée par un génotype, ou profil allélique, défini par les allèles des locus à l'étude.

Une base de données universel peut être réalisée en utilisant les séquences des gènes résultant de la méthode (Maiden *et al.*, 1998, Brehony *et al.*, 2007). Par ailleurs, cette technique est encore coûteuse (2 fois 7 séquences à effectuer) pour des analyses de routine dans des laboratoires d'analyse hospitaliers (Maiden *et al.*, 1998) et les laboratoires de recherche. L'énorme avantage de cette approche est qu'elle est parfaitement reproductible quel que soit le laboratoire puisqu'il s'agit de séquencer et de classer les séquences. Il n'y a pas d'ambiguïté d'interprétation des résultats comme avec des profils de migration multibandes

2.4.6 L'électrophorèse en champs pulsé (PFGE ; Puled Field Gel Electrophoresis) :

Cette technique a été mise au point dans les années 1980 (Egly, 1993 ; Goering, 2010). Elle est souvent considérée comme la meilleure des méthodes de typage moléculaire, car elle a un pouvoir discriminatoire puissant et une plus grande reproductibilité (Tenover *et al.*, 1995 ; Singh *et al.* 2009). Cependant, cette méthode est la plus laborieuse des méthodes d'empreintes génétiques (fingerprinting methods) (Mohania *et al.*, 2008) . Elle est principalement utilisée pour étudier la diversité intra-spécifique et vérifier l'origine des souches (clonalité) (McCartney, 2002 ; Picozzi *et al.*, 2010). En épidémiologie elle est appelée « Gold standard » des méthodes de typage moléculaire des souches (Goering, 2010). Elle a prouvé son efficacité, lors d'une épidémie d'*Escherichia coli* O157:H7, vers la fin de l'année 1992 et au début de l'année 1993, au USA. Les profils PFGE des isolats provenant des patients malade et du patté d'Hamburger incriminé étaient identiques (Barrett *et al.*, 1994). Depuis elle est largement utilisée dans les études des bactéries pathogènes d'origine alimentaire et en épidémiologie (Davis *et al.*, 2003 ; Carriço *et al.*, 2006 ; Barrett *et*

al., 2006 ; Trujillo *et al.*, 2011 ; Kidd *et al.*, 2011 ; Behringer *et al.*, 2011). Son application comme méthode standardisé valable pour la détection de pathogène en épidémiologie alimentaire a été prouvée et a été concrétisée par le regroupement des laboratoires aux USA (National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease, Surveillance, a subsidiary of the Center for Disease Control and Prevention) dans un réseau appelé pulsenet. Cette organisation en réseau Internet a pour but de tracer et de contrôler les bactéries responsables d'épidémies d'origine alimentaire grâce à l'usage de la méthode PFGE, ce qui comporte ; la standardisation de la méthode pour une bactérie spécifique, accès aux profiles PFGE de la bactérie pathogène cherchée pour comparer... etc (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>). De plus en plus de laboratoire suivent la même démarche.

L'usage de la méthode PFGE a été, par la suite, étendu à l'étude de la diversité génétique au niveau de la souche pour les espèces de bactéries lactiques, (Ventura et Zink, 2002; Simpson *et al.*, 2002 ; Dimitrov *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2008; Chaillou *et al.*, 2009 ; Picozzi *et al.*, 2010).

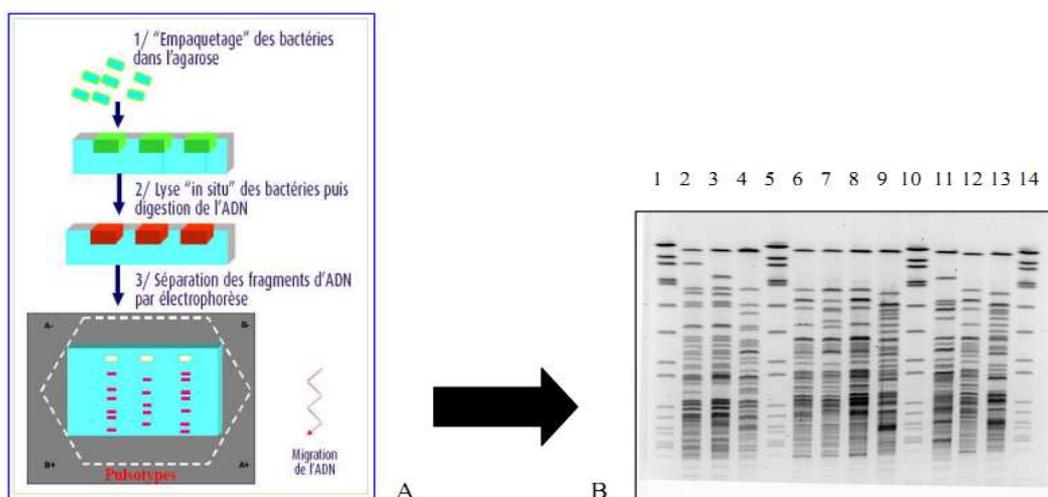


Figure 9 : L'électrophorèse en champ pulsé (A) mode opératoire (B) photo du gel.

Principe de l'électrophorèse en champs pulsé (PFGE) :

Avec cette technique, il n'y a pas d'amplification d'ADN par PCR. Elle fait parti des techniques basées sur la restriction « Restriction Enzyme Analysis » comme le ribotypage. Cependant les profils générés par PFGE représentent la totalité du génome, et cette technique a un pouvoir discriminatoire supérieur à celui du ribotypage (Mohania *et al.*, 2008). La préparation de l'ADN bactérien se fait par lyse *in situ* des cellules bactériennes dans une matrice semi solide d'agarose 'plug', afin de préserver l'intégrité physique de l'ADN. L'ADN est ensuite soumis à l'action d'une enzyme de restriction à site rare, afin de donner une série de fragments dont le nombre et la taille est caractéristique de l'ADN étudié. Le morceau d'agarose contenant l'ADN bactérien digéré est placé en haut d'un gel d'agarose et l'électrophorèse en champ pulsé est réalisée (Fig.9). On utilise alors une électrophorèse avec un champ électrique à orientation variable ou alternée. A chaque changement d'orientation du champ électrique, les fragments les plus grands se réorientent le plus lentement. Par conséquent, les fragments le plus petits vont migrer le plus rapidement (Grattard, 2000). Le champ pulsé permet de séparer des fragments d'ADN de très grande taille, supérieur à 30 kb (Schwartz et Cantor, 1984) ce qui ne peut pas se faire par une électrophorèse conventionnelle (où un constant champ électrique permet de séparer des molécules dont la taille est inférieur à 5Kb).

PFGE réalisée par l'appareil de type CHEF:

Contour Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) est le plus populaire des PFGE appareil. C'est d'ailleurs le type d'appareil qui a été utilisé dans notre étude. Il est de forme hexagonale et de disposition horizontale (Fig. 10A). La migration des fragments d'ADN est réalisée par des pulsations périodiques d'un champ électrique appliqué en différentes directions. Avec un appareil de type CHEF le champ

électrique est appliqué à des angles de 120°C grâce à 24 électrodes (Goering, 2010). D'autres types d'appareil sont utilisés, comme le FIGE, dont le courant électrique alterne avec un angle de 180°C (Fig. 10B). La durée de migration peut être de 3 à 4h alors qu'elle est de 20 à 30 h avec l'appareil de type CHEF. FIGE produit des bandes plus fines et plus compacte que CHEF. L'appareil de type FIGE reste utile pour un screening rapide (Goering, 2010)

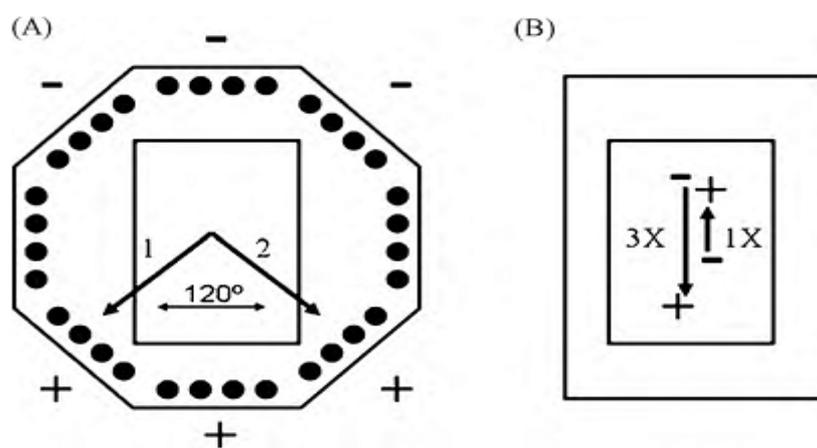


Figure 10 : Schéma représentative des appareils utilisés dans la méthode PFGE. (A) CHEF (B) FIGE.

Optimisation de la méthode PFGE :

L'optimisation porte, en général, sur deux thèmes; la réduction du temps de la réalisation de la technique et l'obtention d'un bon gel.

Les principales limites de cette technique sont sa lenteur d'exécution, environ une semaine à 10 jours, et son coût. Des essais ont été effectués afin de réduire le temps de réalisation de PFGE sur des bactéries spécifiques. Différents paramètres affectent la séparation et la mobilité des molécules d'ADN durant l'électrophorèse. Cela inclut la composition et la concentration du gel, le tampon, la température, le temps de pulsation, temps de migration et le gradient de voltage du champ électrique. En

agissant sur ces paramètres, le temps de migration peut être réduit et par conséquent la durée de migration aussi (McGregor et Yeung, 1992 ; Saeedi *et al.*, 2002 ; Heng *et al.*, 2009).

Plusieurs problèmes, qui varient dans leur complexité, sont rencontrés lors de la réalisation de la méthode PFGE. Ils peuvent être dus à des déficiences à n'importe quelle étape de la manipulation, aux machines utilisées, aux solutions préparées ...etc. Vu la longue durée qui doit s'écouler avant de voir le résultat du gel, le travail doit se faire avec une grande précision. Pour mieux expliquer cela voici quelques exemples ci dessous ;

L'obtention de profils qui ne sont pas droit dans le gel peut être la conséquence d'un défaut au niveau de l'électrode, ou une épaisseur inégale du gel et/ ou le volume du tampon est insuffisant pour couvrir le gel.

Une mauvaise séparation des bandes des profils PFGE peut être le résultat de paramètres de migration inadéquats (temps de pulsation, durée de migration...).

L'apparition de «Smear» peut être due à différents facteurs; une lyse prématurée de la cellule bactérienne avant la réalisation des plug et qui conduit à une dégradation de l'ADN. Une incomplète lyse de la cellule peut aussi causer ce phénomène (par exemple due aux concentrations et/ ou durée d'incubation du lysozyme, protéinase K).

Un lavage inadéquat des plug après l'application de la protéinase K peut aussi engendrer des «Smear». Plus d'exemples et de détails peuvent être retrouvés sur les sites; (http://www.pulseneteurope.org/docs/Troubleshooting_black_and_white.pdf. <http://www.cdc.gov/pulsenet/>).

Certains microorganismes sont non typables par la méthode PFGE à cause d'une activité nucléase qui leur est propre. Ce problème peut être souvent résolu par l'addition de 50–75 mM de Thiouréa dans le tampon de migration (Romling et Tummler, 2000; Corkill *et al.*, 2000). Quoique, dans certains cas le problème persiste malgré l'utilisation de Thiouréa (Kamet *et al.*, 2003).

2.4.7 Random Amplified Polymorphic DNA (ou AP-PCR Arbitrarily Primed PCR):

Considérée comme une méthode rapide, sensible et moins coûteuse pour le typage des différentes souches de bactéries lactiques (Brisabois, 2001 ; Ben Amor *et al.*, 2007). L'ensemble de ces étapes est réalisable dans une journée à deux jours. Elle présente aussi l'intérêt ; qu'aucune information préalable sur le génome analysé n'est requise. Le reproche majeur fait à cette technique est le manque de reproductibilité et de standardisation. Par conséquent, la RAPD n'est pas approprié pour la construction d'une base de données pour l'identification.

Elle a été utilisée avec succès pour différencier les bactéries lactiques au niveau intra-spécifique (Johansson *et al.*, 1995; Berthier et Ehrlich, 1999 ; Plengvidhya *et al.*, 2004), au niveau inter-spécifique pour les entérocoques (Descheemaeker *et al.*, 1997), *Lactococcus* (Nigatu *et al.*, 1998), les lactobacilles (Du Plessis et Dicks, 1995 ; Khaled Daud *et al.*, 1997 ; Gancheva *et al.*, 1999 ; Nigatu *et al.*, 2001), et au niveau inter-genre (Cocconcelli *et al.*, 1995 ; Moschetti *et al.*, 2001 ; Yost et Nattress, 2002 ; Rossetti et Giraffa, 2005).

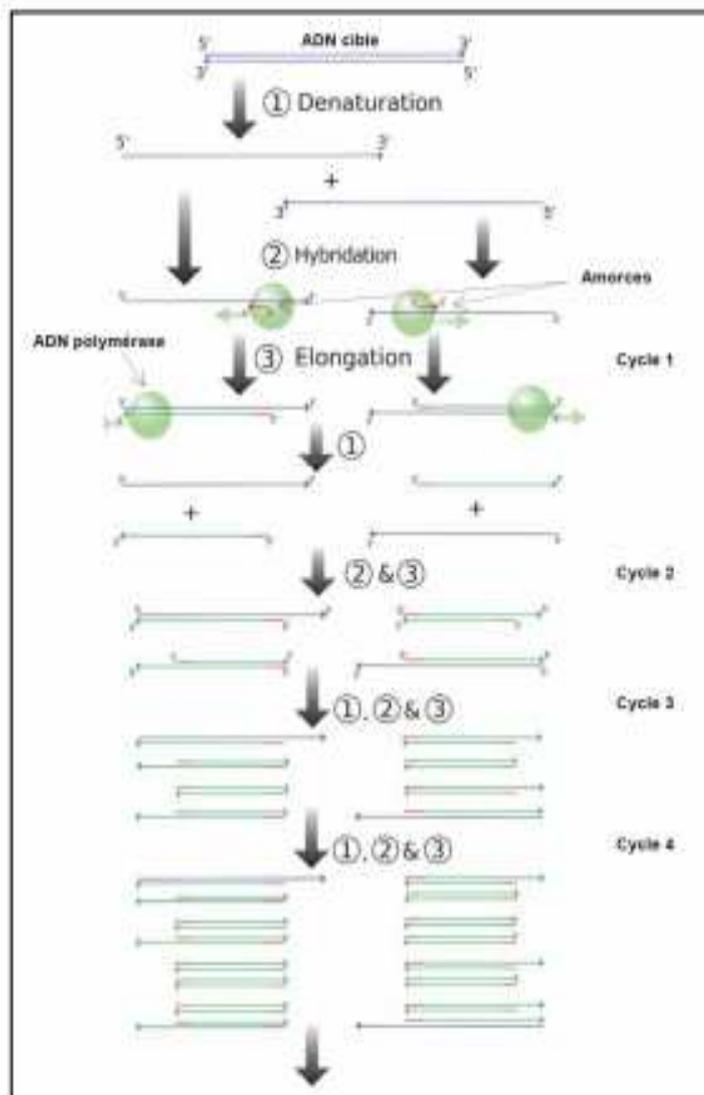


Figure 11 : Amplification d'une séquence d'ADN par PCR.

Principe de la technique RAPD-PCR :

Cette technique a été décrite simultanément pour la première fois en 1990 par Williams (1990) et Welsh (1990). Le principe est basé sur l'utilisation d'amorces aléatoires courtes (9 à 10 pb) qui s'hybrident avec l'ADN chromosomique à faible température d'hybridation et vont permettre d'initier l'amplification d'un certain nombre de régions du génome (Fig. 11). Les amorces utilisées sont déterminées de façon empirique. Le nombre et la localisation des sites d'hybridation des amorces

donnent des profils spécifique à la bactérie. Là aussi, les fragments amplifiés seront séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1.5-2.0%). Les profils obtenus sont analysés et comparés (Kumar et Gurusubramanian, 2011).

Le problème de reproductibilité de la RAPD-PCR :

Malgré les progrès énormes réalisés dans les techniques moléculaires qui ont permis la collecte des données génétiques, la RAPD-PCR reste une méthode utile pour différentes raisons (Lacerda *et al.*, 2002 ; Magalhães *et al.*, 2007 ; Brahmane *et al.*, 2008; Dutra *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2008). Elle peut être utilisée pour l'évaluation d'une population, pour laquelle aucun marqueur spécifique n'a été développé, permettant un screening rapide de la variabilité génétique. C'est la technique la moins chère, qui n'implique pas des procédures complexes de séquençage, nécessitant seulement un laboratoire simple avec un minimum d'équipement pour réaliser la PCR.

Son principal inconvénient est sa faible reproductibilité qui peut être affecté par même de faibles variations dans l'expérimentation et de ce fait une bonne optimisation et standardisation est nécessaire pour atteindre une reproductibilité satisfaisante (Sanchez *et al.*, 2004 ; Singh *et al.*, 2009 ; Skorić *et al.*, 2012) .

La reproductibilité est influencée par de nombreux facteurs comme la concentration et la marque de la Taq polymérase, la concentration d'amorces, la concentration et la qualité de l'ADN, les caractéristiques du tampon, la marque et le calibrage du Thermocycleur, le programme de thermocyclage appliqué, les conditions de l'électrophorèse (Van Belkum *et al.*, 1995 ; Saunders *et al.*, 2001 ; Skorić *et al.*, 2012). Selon les conditions d'optimisation appliquées à l'expérience de la RAPD-

PCR une reproductibilité (et répétabilité) de 100% peut être atteinte (Myers *et al.*, 1993 ; Moschetti *et al.*, 1998 ; Payne *et al.*, 1999 ; Venturi *et al.*, 2012)

2.4.8 Méthodes appliquées à l'étude de la diversité génétique des souches de *Streptococcus thermophilus* :

La combinaison des propriétés phénotypiques et des informations génotypiques a été utilisée pour l'étude de la diversité des souches à l'intérieur de l'espèce *St. thermophilus*. La caractérisation de la diversité génétique chez les souches de *St. thermophilus* a été étudiée la première fois par la méthode AFLP et dont le résultat a démontré une grande variabilité génétique au sein de cette espèce (Colmin *et al.*, 1991 ; Salzano *et al.*, 1993 ; Lazzi *et al.*, 2009)

Les méthodes de PFGE et RAPD-PCR ont décelé un degré élevé de variabilité à l'intérieur de l'espèce, au niveau intra-spécifique (Moschetti *et al.*, 1998 ; Giraffa *et al.*, 2001 ; Mora *et al.*, 2002 ; Jenkins *et al.*, 2002). Contrairement au résultat de l'investigation de la diversité génétique par comparaison des séquences de l'opéron lacSZ de 29 souches de *Streptococcus thermophilus* qui a montré une légère variabilité (Ercolini *et al.*, 2005). La diversité génétiques de 27 souches de l'espèce *St. thermophilus* a été également estimée par multilocus typing méthode (MLST) en se basant sur les variations des séquences de huit gènes de ménage (housekeeping genes ; *ilvC*, *pepO*, *pyrE*, *glcK*, *ddlA*, *thrS*, *dnaE* and *tkt*). Un faible polymorphisme dans la population de *St. thermophilus* a été révélé par cette technique (Bolotin *et al.*, 2004 ; Hols *et al.*, 2005). Senini *et al.*, (2004) ont proposé d'utiliser la distribution des gènes *eps* genes comme moyen de typage des souches de *St. thermophilus*. Horvath *et al.* (2008) émettent l'hypothèse que les loci CRISPR pourraient être valable pour le typage et la comparaison des souches de *St. thermophilus*. Cette espèce possède 3 loci

CRISPR1, CRISPR2 et CRISPR3 dont la comparaison des séquences entre différentes souches a révélé un polymorphisme.

2.4.9 Evaluation des méthodes de typage :

Les paramètres les plus importants pour évaluer l'efficacité d'une technique de typage sont ; la typabilité, la reproductibilité, le pouvoir discriminant, la faisabilité (Tab.2) (Struelens, 1996)

La typabilité (T) : c'est à dire la possibilité d'obtenir un résultat pour chaque isolat analysé. Les isolats non typables ne sont pas interprétables. C'est la portion de souches assignées à un type par la méthode de typage. T est égale au nombre d'isolats assignés à un type / nombre d'isolats testés.

La reproductibilité R : c'est le fait d'obtenir le même résultat pour un isolat typé plusieurs fois dans des essais indépendants. R doit être égal ou supérieure à 0.95. Une faible reproductibilité peut refléter des variations au niveau de la technique ou des variations du matériel biologique.

On peut calculer R par le nombre d'isolats assignés au même type en reportant l'expérience sur le nombre d'isolats testés.

Pouvoir discriminant : Idéalement, chaque isolat non relié aux autres devrait être identifié comme unique. Il correspond à la probabilité moyenne de classer en type distincts deux isolats échantillonnés au hasard dans l'espèce étudiée. Il peut être exprimé par le calcul de l'indice de diversité de Simpson (DI) (Voir la partie Matériel et Méthodes du manuscrit)

La facilité d'interprétation est également importante. En effet, de pouvoir comparer les données de typages réalisées dans des laboratoires différents est nécessaire, si on veut, par exemple, distinguer des souches de *St. thermophilus*, selon leurs propriétés technologiques à l'échelle d'un pays ou Mondial. Une technique difficile à interpréter sera très difficilement mise à profit hors du laboratoire.

La faisabilité d'une technique repose sur plusieurs critères : l'accessibilité à la technique, les délais d'obtention des résultats, l'expertise technique nécessaire, le coût du matériel, les réactifs nécessaires, et enfin l'utilité de la technique pour un grand nombre de microorganismes (Van Belkum *et al.*, 2001).

2.5 Analyse et interprétation des résultats de typage par PFGE et RAPD-PCR :

L'importance des résultats obtenus d'une expérience réside dans le degré avec lequel l'information produite puisse bien être comprise et analysée. L'étude de la diversité génétique entre les souches de *Streptococcus thermophilus* via les méthodes PFGE et RAPD-PCR consiste, principalement, à faire une comparaison entre les profils génétiques obtenus de deux souches ou plus, afin de déterminer leur proximité génétique.

2.5.1 Assistance informatique pour l'analyse des profils obtenus par les méthodes PFGE et RAPD-PCR :

Les images des gels des expériences de PFGE et RAPD-PCR obtenues sont en général observées à l'œil nu pour avoir une première idée des relations génomiques entre les différentes souches étudiées. Des logiciels commerciaux, dont le prix est très élevé, comme BioNumerics et GelCompar (Applied Maths, Sint-Martens-Latem,

Belgium) et Diversity DatabaseFingerprinting Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca), aident à faire une analyse plus efficaces des profils en particulier lorsque le nombre de souches étudiées est élevé (Fig. 13). Le logiciel permet letraitement, la normalisation de l'image et la détection des bandes (voir Gel compar II Manual Version 6.5). La normalisation consiste en une correction des distances de migration en fonction des marqueurs de taille de façon à tenir compte des variations dues aux aléas de la migration (Fig. 12). En dépit de la sophistication des programmes, la détection des bandes par le logiciel doit être corriger manuellement par l'utilisateur (Rementeria *et al.*, 2001 ; Davis *et al.*, 2003 ; Van Belkum *et al.*, 2007). L'image est ainsi archivée et servira à des comparaisons des lignes inter et intra gel utilisée. Ultérieurement, une comparaison de ces données entre différents laboratoires et/ou après une période de plusieurs année pourra se faire à condition d'utiliser les même référence ou marqueur de poids moléculaires (Goering, 2010).



Figure 12: Normalisation des profils de la méthode PFGE par le logiciel Gel compar II version 6.5.

L'interprétation des profils ou des fragments obtenus se base sur les distances de migration ou sur le calcul des poids moléculaires de chacun des fragments. Le degré de parenté entre différentes souches se déduit alors de la comparaison des distances de migration des fragments du profil obtenu pour chacune des souches étudiées.

Le regroupement d'isolats ou les relations entre isolats reposent donc principalement sur la comparaison des profils obtenus.

Cette comparaison utilise des coefficients de similitude qui analyse les profils deux à deux, comme les coefficients de Dice, de Jaccard, de Pearson, Euclidean Distance Squared coefficient, de Jeffrey's et de X, Ochinai...etc

Le coefficient de Dice S_D correspond au rapport du nombre de fragments communs multiplié par deux sur le nombre total de fragments observés dans les deux profils.

Ces coefficients sont calculés automatiquement avec certains logiciels

$$S_D = \frac{2N_{AB}}{N_A + N_B}$$

(N_A et N_B : Nombre de bandes dans les profils A et B, respectivement. N_{AB} : Nombre de bandes communes entre les deux profils A et B)

Après comparaison deux à deux de tous les profils, une matrice des similitudes peut être alors obtenue permettant de construire une représentation graphique des distances entre les souches sous forme de dendrogramme. Celui-ci peut, notamment, être obtenu par les méthodes de groupement par la distance moyenne ou UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), Single Linkage (Nearest Neighbor or Minimum Method), Complete Linkage (Furthest Neighbor or Maximum Method),

Weighted Pair Group Method (WPGAMA) ou Ward ...etc. Ces méthodes de groupement sont disponibles dans les logiciels bioinformatiques précédemment cités.

Le coefficient de Dice et la méthode de regroupement UPGMA sont majoritairement utilisés pour l'étude des profils PFGE et RAPD-PCR des bactéries lactiques (Giraffa *et al.*, 2001 ; Moschetti *et al.*, 2001 ; Ventura et Zink, 2002 ; Simpson *et al.*, 2002 ; Jenkins *et al.*, 2002 ; Andrighetto *et al.*, 2002 ; Sanchez *et al.*, 2004 ; Rossetti et Giraffa, 2005 ; Cai *et al.*, 2007 ; Michaylova *et al.*, 2007 ; Ruiz *et al.*, 2008 ; Siragusa *et al.*, 2009 ; Lazzi *et al.*, 2009 ; Jevaba *et al.*, 2011 ; Morandi et Brasca, 2012)

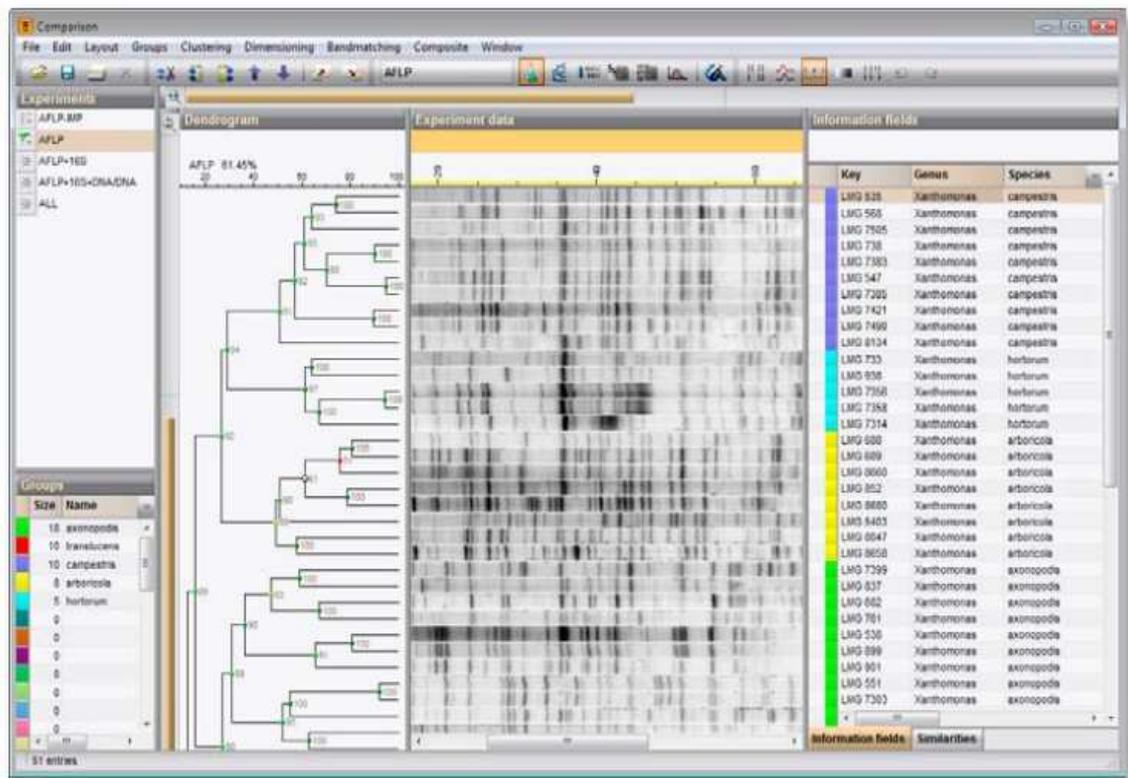


Figure 13: Réalisation d'un dendrogramme à partir des profils PFGE par le logiciel Gel compar II version 6.5.

2.5.2 Événements génétiques affectant les profils obtenus des méthodes PFGE et RAPD-PCR :

Les deux méthodes détectent le polymorphisme au niveau du génome bactérien.

Les profils RAPD-PCR résultent de l'amplification de parties de longueurs variables du génome, selon la position du site spécifique à l'amorce, donnant des bandes de différents poids moléculaires (différentes distances) sur le profil et qui sont spécifiques à une souche donnée. La méthode RAPD-PCR détecte le polymorphisme engendré par différents phénomènes de mutation au niveau du site d'appariement de l'amorce : les substitutions nucléotidiques, les insertions ou les délétions. Un changement au niveau du site spécifique donnerais un non appariement de l'amorce avec son site spécifique au niveau du génome, et donc pas d'amplification. Le résultat sur le profil RAPD-PCR est une perte d'une bande. Le contraire, c'est à dire l'apparition d'une bande supplémentaire, est possible si l'événement génétique conduit à l'apparition d'un site spécifique qui s'apparierait à l'amorce.

Les profils PFGE résultent de la migration de la totalité du génome bactérien digéré par l'enzyme de restriction. Un événement génétique qui se produirait au niveau du site de restriction influencerait le poids moléculaire des macro-fragments de restriction sur le profil PFGE (Goering, 2010).

En 1995, Tenover et collaborateurs ont proposé un système de standardisation et d'interprétation des profils obtenus par champ pulsé, applicable à l'épidémiologie, pour déterminer la relation entre les isolats étudiés (Tenover *et al.*, 1995). Les «règles» suivantes d'interprétation des profils sont suivies (Fig 14) :

- si deux isolats ont le même profil PFGE (0 événement génétique détecté, 0 fragments différents), on considère qu'il s'agit de la même souche.
- des souches sont considérées étroitement liées lorsqu'elles ont un seul événement génétique de différence, ce qui se traduit par une différence dans le profil au niveau de 2 à 3 bandes (addition ou délétion d'un site de restriction).
- des souches probablement liées ont 4 à 6 bandes différentes, cela est dû à deux événements génétiques.
- des souches qui ont 7 bandes ou plus de différence, du à 3 événements génétiques ou plus, sont considérées comme différentes.

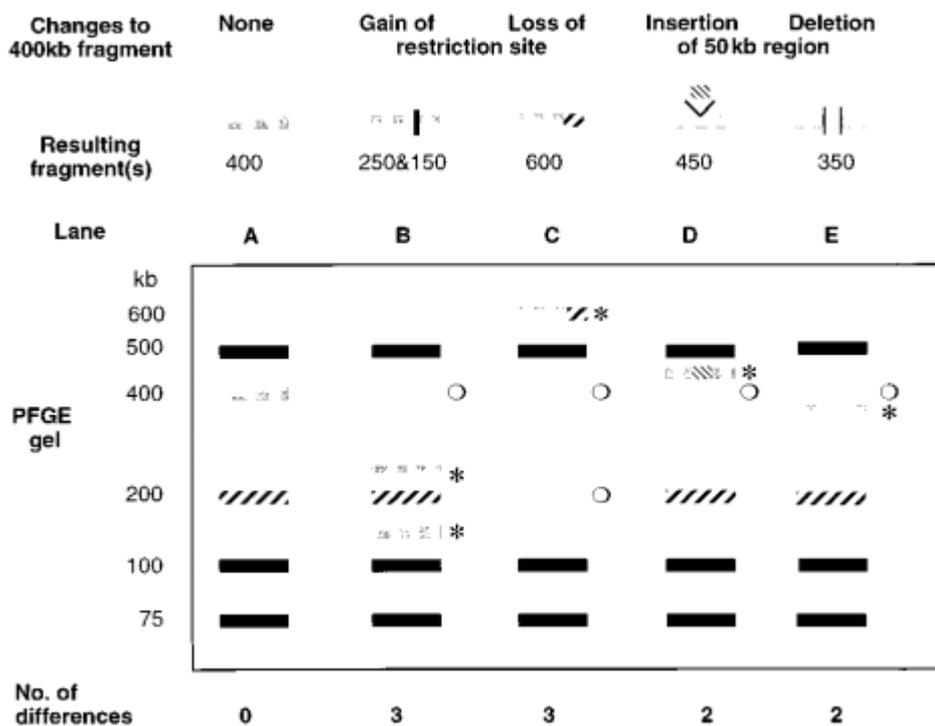


Figure 14 : Schéma présentant les modifications intervenant dans les profils PFGE d'un isolat testé suite à des évènements génétiques variés.

Voie A, profil de Référence ; Voie B, gain d'un site de restriction ; Voie C, perte d'un site de restriction ; Voie D, insertion d'ADN dans un fragment préexistant ; Voie E, deletion d'ADN

d'un fragment préexistant. Les petits cercles indiquent des fragments présents dans le profil de référence et absent de l'isolat testé après un événement génétique. L'asterixe indique un fragment présent après un événement génétique mais absent du profil de référence (d'Après Tenover *et al.*, 1995).

2.5.3 Congruence entre les résultats de deux méthodes de géotypage :

Cas des dendrogrammes obtenus à partir des profils PFGE et RAPD-PCR :

La Congruence exprime la corrélation ou la correspondance entre les résultats de deux méthodes. Si une certaine congruence est trouvée entre deux méthodes de typages cela permet une plus grande confiance dans les résultats et donc une meilleure caractérisation des souches étudiées.

Ce genre d'étude, souvent, repose sur la comparaison des clusters résultant des dendrogrammes de deux méthodes. D'un point de vue qualitatif cela indique la correspondance entre les types résultants des dendrogrammes de la méthode PFGE et les types résultants des dendrogrammes de la méthode RAPD-PCR. Par exemple on peut avoir la comparaison suivante ; les souches S1, S2, S3, S4 se trouve dans un même type (cluster) selon PFGE, avec RAPD-PCR les souches S1, S2, S3 sont dans un même cluster distinctement de S4 qui se trouve dans un autre cluster (deux types différents selon RAPD-PCR) (Ventura et Zink, 2002; Coenye *et al.*, 2002; Picozzi *et al.*, 2010). Quoique cette manière de comparer est utile, elle ne permet pas une vue plus large sur comment les résultats des méthodes de typage sont reliés. Pour atteindre cet objectif, la comparaison devrait être complétée par des mesures quantitatives comme par exemple le calcul de l'indice Ajusté de Rand et l'indice de Wallace (Carrico *et al.*, 2006).

L'indice Ajusté de Rand, permet une évaluation quantitative globale de la congruence entre deux méthodes de typage. L'indice de Wallace permet d'estimer, pour une

méthode de typage donnée, combien d'informations nouvelles peuvent être obtenues d'une autre méthode de typage. En d'autres termes, si la partition obtenue à partir d'une méthode de typage pouvait être prédite à partir des résultats de l'autre méthode de typage (Carriço *et al.*, 2006).

2.5.4 Multidimensional Scaling et Dendrogramme :

Ce sont deux méthodes de regroupement permettant de représenter différemment les proximités entre les éléments (souches) :

Le Multidimensional Scaling (MDS) est une méthode d'analyse multi-variée descriptive, qui permet de "projeter" dans un espace métrique, une matrice ordinale indiquant les proximités (ou similarités) d'objets deux à deux, tout en conservant le plus exactement possible l'ordre des proximités d'objets.

Le dendrogramme est un algorithme de construction hiérarchique par agglomérations successives ou constructions ascendantes hiérarchiques.

Le principe est très simple dans son fondement. On part d'un ensemble de (n) éléments dont chacun possède un poids, et entre lesquels on a calculé des distances entre les différents couples possibles. On commence par agréger les deux éléments les plus proches. Le couple ainsi agrégé constitue alors un nouvel élément dont on peut recalculer à la fois le poids et les distances à chacun des éléments qu'il reste à classer. A l'issue de cette étape, le problème se trouve ramené à celui de la classification de ($n-1$) éléments. On agrège à nouveau les deux éléments les plus proches, et l'on réitère ce processus ($n-1$) fois au total) jusqu'à épuisement de l'ensemble des éléments.

L'ultime et (n-1)^{ème} opération regroupe l'ensemble des éléments au sein d'une classe unique.

La méthode UPGMA ('unweighted pair-group method using the arithmetic average') ou la méthode non pondérée des regroupements en paires sur la base de la moyenne arithmétique. Elle minimise la distance entre groupes en prenant la distance moyenne entre toutes les paires d'individus de l'échantillon.

Ces deux types d'analyse sont réalisés à l'aide de logiciel comme XLSTAT (Addinof) et Gel compar II version 6.5.

2.6 L'objectif du travail :

Streptococcus thermophilus est une bactérie lactique très importante dans la fabrication du yaourt et différents fromages. La sélection de nouvelles souches, à haut potentiel technologique, afin de développer des ferments thermophiles, requière une méthode d'analyse rapide permettant une identification au niveau de la souche et l'estimation de la diversité génétique. Une telle méthode peut être aussi utile pour la traçabilité des souches de *St. thermophilus* dans les domaines de la production et l'industrie laitières. Il en découle, un typage des souches de *St. thermophilus* nécessiterait, une méthode fiable, reproductible, avec un pouvoir discriminant élevé comme celles basées sur la caractérisation génétique.

Les deux méthodes PFGE et RAPD-PCR ont été recommandées par FAO/WHO en 2002 (N.N., 2006) pour le typage des probiotiques et sont largement appliquées aux bactéries lactiques comme il a été déjà mentionné.

L'objectif est d'étudier la diversité génétique de 59 souches de *Streptococcus thermophilus* par les méthodes RAPD-PCR et PFGE. La première rapide, mais

réputée pour sa faible reproductibilité, la seconde reproductible, mais dont la réalisation est longue.

Deux enzymes de restrictions *SmaI* et *ApaI*, et trois amorces XD9, M13, OPI-02 MOD ont été sélectionnés pour réaliser ce travail. elles sont largement utilisés selon la littérature et ont données de bon résultats dans la différenciation des souches de *Streptococcus thermophilus* (Boutrou *et al.*, 1995 ; O’Sullivan et Fitzgerald, 1998; Moschetti *et al.*, 1998 ; Giraffa *et al.*, 2001 ; Jenkins *et al.*, 2002; Andrighetto *et al.*, 2002; Mora *et al.*, 2002 ; Sanchez *et al.*, 2004 ; Michaylova *et al.*, 2007; Girard et Moineau, 2007 ; Tosi *et al.*, 2007 ; Lazzi *et al.*, 2009; Rizzotti *et al.*, 2009; Morandi et Brasca, 2012). Par la suite, afin d’évaluer la fiabilité des deux méthodes PFGE et RAPD-PCR appliquées, dans le typage des souches de *Streptococcus thermophilus*, leur reproductibilité, leur pouvoir discriminant et la corrélation entre celles-ci ont été abordés.

D’après la littérature qui a été consultée c’est la premières fois que le typage de souches de *Streptococcus thermophilus* a comporté, non seulement, une comparaison entre les résultats de la PFGE (avec chaque enzyme de restriction) et ceux de RAPD-PCR (avec chaque amorce), mais en plus, une analyse numérique combinée des profils RAPD-PCR avec les différentes amorces et celle des profils PFGE avec les enzymes de restriction ont été aussi incluses. Une interprétation des résultats des profils de la PFGE avec les critères de Tenover *et al.* (1995) a été réalisée. Et enfin, les résultats illustrés via les deux méthodes UPGMA et le Multidimensional Scaling ont été comparés.

MATERIEL ET METHODES

1. Les souches de *Streptococcus thermophilus* utilisées et conditions de cultures :

Au Total 59 souches de *Streptococcus thermophilus* ont été étudiées (Tab. 3). Les souches ont été conservées dans du M17 à 20% de glycerol à -80°C.

Tableau 3: Données sur les souches de *St. thermophilus* utilisées dans cette étude.

Origine des souches	Origine géographique	Codes des souches
K1 yaourt	Kemah, Erzincan	K1-15, K1-12, K1-1, K1-27, K1-28, K1-2, K1-19, K1-11, K1-9, K1-21, K1-22, K1-26, K1-31, K1-13, K1-14, K1-30, K1-23, K1-24, K1-29, K1-16, K1-7, K1-20, K1-18
S1 yaourt	Çukurbağ, Mersin	S1-3, S1-1
N8 yaourt	Elbeyli, Mersin	N8-2
N1 yaourt	Sarıaydın, Mersin	N1-1
N2 yaourt	Yağcılar, Antalya	N2-3, N2-4, N2-1
N3 yaourt	Seydi, Antalya	N3-1, N3-3, N3-7, N3-6, N3-2, N3-4
N4 yaourt	Karaahmetli, Antalya	N4-2, N4-3, N4-1
N5 yaourt	Albeyli, Antalya	N5-4, N5-5, N5-7, N5-2, N5-3, N5-1, N5-6
N6 yaourt	Güneyli, Mersin	N6-5, N6-1, N6-2, N6-6, N6-3, N6-4
N9 yaourt	Kıca, Mersin	N9-4, N9-2, N9-1
D1 Ferment commercial	Danisco culture	Ta040-1, Ta040-2
D2 ferment commercial	Danisco culture	Yo-mix 410-3
	BCCM/LMG Bacteria collection, Gent, Belgium	LMG18311

2. Typage moléculaire par Electrophorèse en Champ Pulsé (ECP) de *Streptococcus thermophilus*:

Pour cette technique, l'extraction de l'ADN s'effectue après inclusion des bactéries dans une matrice semi-solide d'agarose. L'ensemble est appelé Insert (plug). L'extraction de l'ADN a été répétée deux fois pour une dizaine de souches, à différents intervalles de temps. Les étapes de restriction et de migration ont

été réalisées pour l'ensemble des 59 souches étudiées sur différents gels, à différents jours, avec, 2 et 3 répétitions pour *ApaI* et *SmaI* enzyme, respectivement.

L'expérience a été réalisée essentiellement comme décrit par O'Sullivan et Fitzgerald (1998) avec quelques modifications

2.1 Préparation des blocs d'agarose :

100 µl de cultures stock conservées à -80°C ont étéensemencés dans 10 ml de milieu M17 liquide (pH 6.8) suivie d'une incubation 18 h à 42°C. 50 µl de la culture ainsi obtenue ont été mises dans 10 ml de M17 liquide (pH 6.8) puis incubés 8 h à 42°C. A partir de cette dernière culture, des flacons de 100 ml de M17 sont inoculés à 2% et incubés durant la nuit. Les cellules ont été récupérées par centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min, puis lavées dans 100 ml de solution d'EDTA à 50 mM à pH 8.5. (La solution dont la densité optique était ajustée de 0.8 à 1 pour une longueur d'onde de 600 nm). Ensuite le culot récupéré par une centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min a été mis en suspension dans 1,5 ml du même tampon. 0,5 ml de cette suspension cellulaire ont été incubés à 45° C pendant 10 min ensuite mélangés avec 1,5 ml d'agarose à 1% dans 50 mM EDTA, pH 8.5 (molten low melting point agarose, Prona), préalablement fondue et maintenu à 45°C pendant 10 min. Le mixage se fait soigneusement à l'aide de la micropipette pour éviter d'endommager l'ADN et la formation de bulles. Le mélange est immédiatement coulé dans des moules adapté (plug mould well) et laisser à polymériser pendant 15 à 30 min à température ambiante.

2.1.1 Lyse des cellules à l'intérieur des inserts d'agarose (plug) :

Les inserts ont été démoulés et transvasés dans des tubes contenant 10 ml de la solution I (50 mM EDTA contenant 2 mg/ml de lysozyme (Amersco) et 0.05% (w/v) de N-lauryl sarcosine) (Annexe) et incubés à 37°C pendant 4 h. Les inserts sont ensuite transférés dans des tubes contenant 3 ml de Solution II (1% (w/v) SDS, 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.5) (Annexe) et incubés à température ambiante durant 30 min. Suivie d'une incubation de 36 h à 50°C, immergés dans la Solution II contenant 2 mg/ml de protéinase K (Merck, Sigma). Les inserts (plugs) sont, par la suite, lavés neuf fois pendant 30 min dans 10 ml de solution d'EDTA 50 mM (pH 8.5) à 4°C. La conservation des inserts se fait dans la même solution précédente à 4°C durant une période d'une année.

2.1.2 Digestion de l'ADN avec les enzymes de restriction *SmaI* et *ApaI* :

La digestion de l'ADN des souches de *Streptococcus thermophilus* a été réalisée sur des sections d'à peu près 2 mm, avec 3U de *SmaI* et 20 U d'*ApaI*. Les sections ont été obtenues en coupant les inserts, posés à l'intérieur d'une boîte de Pétri stérile, avec des lamelles en verre flambées à l'alcool. Chaque insert a été divisé en 4 sections. Les sections ainsi préparées ont subi deux lavages successives, pendant 15 mn, dans 1 ml d'eau distillée stérile, refroidie et maintenue dans de la glace. Un lavage, à température ambiante, dans 200 µl du tampon approprié à l'enzyme de restriction à 1X, pendant 15 mn (20 µl de Tampon de restriction 10X+ 180 µl d'eau distillée stérile + une section). Le tampon a été remplacé par 200 µl de la solution avec Fast digest *SmaI* (177µl d'eau distillée stérile + 20µl de tampon de l'enzyme 10X + 3µl Fast digest *SmaI* (Fermentas FD 0663) + une section) ou la solution de Fast digest *ApaI* (160 µl

d'eau distillée stérile + 20µl de tampon d'enzyme 10 X + 20 µl Fast digest *ApaI* (Fermentas FD 1414) + une section). Les eppendorfs contenant les sections bien immergées dans la solution d'enzyme sont incubés à 37°C pendant 15 h, dans un bain Marie. A la fin de cette période la solution d'enzyme est remplacée par la solution de tampon EDTA 50 mM (pH 8.5) et les eppendorfs maintenus à 4°C jusqu'à utilisation (afin d'inactiver l'enzyme).

2.2 Les conditions de migration :

L'ADN génomique ainsi digéré à l'intérieur des sections d'agarose a été immergé dans 200 µl de tampon TBE 0.5 X et laissé à température ambiante durant 30 à 45 minutes. Chaque bloc d'agarose du marqueur de poids moléculaire Lambda ladder (BIO RAD 170-3635) a été coupé en 6 parties. Chaque partie est mise dans un Eppendorf contenant 0.5 ml de TBE 0.5 X. Les Eppendorfs sont ensuite incubés à 45°C durant 10 mn puis placés dans de la glace jusqu'à chargement de l'ADN génomique et l'ADN marqueur de poids moléculaire sur le gel. Cette incubation permet d'hydrolyser le concatémère formé par l'ADN du Lambda ladder.

Il a été ensuite séparé par électrophorèse en champ pulsé.

L'unité de l'appareil d'électrophorèse (Amersham Gene Navigator) a été remplie avec 5000 ml de tampon TBE 0.5 X additionné de 50 µM de Thiourea.

1.2 g d'agarose d'électrophorèse en champ pulsé certifié (BIO RAD162-0137) ont été ajoutés à 120 ml de tampon TBE 0.5X . Cette agarose à 1 % a été liquéfié dans un four à micro-onde et refroidie à 50°C à la température ambiante.

La plate forme de coulage du gel, le peigne et le cadre en caoutchouc ont été nettoyés avec l'alcool juste avant utilisation. Les sections de l'ADN de nos souches et du marqueur de poids moléculaire ont été déposées à l'aide d'une spatule nettoyée à l'alcool à l'extrémité des dents du peigne. Le gel refroidi à 50°C a été soigneusement coulé dans la plate forme de coulage, en évitant la formation des bulles d'air et de déloger les sections. Après solidification du gel, le peigne et le cadre en caoutchouc ont été enlevés et le gel sur la plateforme placé à l'intérieur de l'unité de l'appareil d'électrophorèse. Différents programmes ont été testés pour *SmaI* et *ApaI* enzymes. En définitif, les conditions suivantes ont été appliquées :

Pour L'enzyme *SmaI* ;

-Temps d'impulsion;

Phase 1: 7s (6 h)
Phase 2: 7s (6 h)
Phase 3: 10s (6 h)
Phase 4: 15s (5 h)

-Voltage = 200V

Pour l'enzyme *ApaI*;

-Temps d'impulsion;

Phase 1: 2s (6 h)
Phase 2: 4s (6 h)
Phase 3: 8s (6 h)
Phase 4: 12s (5 h)

-Voltages= 200V

2.3 Révélation du gel:

Les gels d'électrophorèses ont été colorés avec 0.5 mg de bromure d'éthidium dans 500 ml d'eau distillée durant 30 min dans un récipient couvert à l'abri de la lumière.

Ils sont ensuite décolorés dans de l'eau distillée pendant 60 min (l'eau distillée est renouvelé chaque 20 min). Le gel décoloré est placé dans l'UV box et la photo est prise en utilisant TIFF files avec le Gel Doc XR digital imaging system (Bio-Rad).

3. Typage des souches de *Streptococcus thermophilus* par RAPD-PCR

3.1 L'extraction de l'ADN :

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée à l'aide du kit Gene JET™ Genomic DNA Purification (K0721 Fermentas). Selon, principalement, les conditions spécifiées par le fournisseur.

- 100 µl de la culture de *Streptococcus thermophilus* conservée au glycérol, à -80°C, ont été inoculés dans un tube de 10 ml de M17 (pH 6.8) et incubés pendant 18 h à 42°C. Ensuite, 100 µl de cette dernière culture ont étéensemencés dans des flacons de 20 ml de M17 (pH 6.8) et incubés jusqu'à atteindre une densité optique de 1,3 à 2 à 600 nm. La culture obtenue est centrifugée à 4000 rpm pendant 10 min et le culot resuspendue dans 1 ml d'eau distillée stérile dans un eppendorf.
- Les cellules bactériennes dans l'eppendorf, ont été collectées par centrifugation à 15000 rpm pendant 3 min et resuspendues dans 180 µl de tampon de lyse des bactéries à Gram+ (Annexe) additionné de 20 mg/ml de lysozyme puis incubation pendant 40 min à 37°C.
- A chaque eppendorff, ainsi préparé, ont été ajoutés 200 µl de solution de lyse et 20 µl de protéinase K et agité vigoureusement afin d'obtenir une suspension uniforme.

- L'échantillon ainsi préparé a été incubé à 56°C, avec agitation de temps à autre, pendant 40 min jusqu'à ce que les cellules soient complètement lysées.
 - 20 µl de RNase A solution ont été ajoutés, vortexés et la mixture a été incubée pendant 10 min à la température ambiante.
 - 400 µl d'éthanol à 50 % ont été ajoutés et mixés à l'aide de la pipette et du vortex.
- Le lysat préparé a été transféré dans une colonne de purification de l'ADN Gene JET™. La colonne a été centrifugée pendant 1 mn à 15000 rpm. Les tubes de la collection contenant le surnageant ont été jetés. La colonne de purification de l'ADN Gene JET™ a été placée dans un nouveau tube de 2 ml de la collection. Ensuite ont été ajoutés successivement.

500 µl de Wash Buffer I (additionné d'éthanol à 96%). Centrifugation pendant 1 min à 15000 rpm. Puis 500 µl de Wash Buffer II (additionné d'éthanol à 96%). Centrifugation pendant 3 min à 12000 rpm.

- les colonnes de purification de l'ADN GeneJET™ ont été transférées à des tubes stériles de microcentrifugation 1.5 ml.
- 50 µl of de tampon de centrifugation ont été ajoutés au centre de la membrane de la colonne de purification GeneJET™ afin d'éluer l'ADN. Incubation pendant 2 min à température ambiante et centrifugation 1 min 12000 rpm. La concentration de l' DNA résultant a été mesurée avec le Nanodrop (nanogramme/µl) ainsi que le Ratio A260/A280 pour confirmer la pureté de l'ADN extrait. L'ADN purifié est conservée à – 20°C jusqu'à utilisation.

3.2 Optimisation de la méthode RAPD-PCR :

Trois amorces, synthétisées par metabion international AG (Allemagne), ont été testées :

L'amorce XD9 (5'-GAAGTCGTCC-3') (Moschetti *et al.*, 1998),

L'amorce OPI-02 MOD (5'-GCTCGGAGGAGAGG-3') (Mora *et al.*, 2002)

Et l'amorce M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') (Cebeci Aydin, 2008)

Afin d'optimiser le résultat de l'amplification PCR de l'ADN, différentes concentrations de matrice d'ADN, de l'enzyme Taq DNA polymerase et des trois amorces ont été testées comme suit : les concentrations de 40, 60, 80, 100 et 150 ng d'ADN. Des concentrations de 0.5, 1, 1.25, 1.3, 1.5, 2, 2.5 et 3.5 U de Taq DNA polymerase (Fermentas). Les concentrations d'amorces testées étaient de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 et 1 μ M. Les concentrations de MgCl₂ utilisées étaient de 3.5 mM avec l'amorce XD9, 2.5 mM avec l'amorce OPI-02 MOD et 3 mM avec l'amorce M13. Les concentrations des dNTPs (200 μ mol l⁻¹ of each dATP, dCTP, dGTP and dTTP) ont été maintenues constantes. Ces valeurs ont été données par Fermentas et les auteurs cités ci-dessus. Pour chaque mélange réactionnel, des contrôles négatifs, exempts d'ADN, ont été réalisés. Les contrôles négatifs et les marqueurs de poids moléculaires ont été inclus dans chaque gel.

La reproductibilité de la méthode a été estimée en répétant, au moins deux fois, l'extraction de l'ADN et l'amplification RAPD-PCR, avec chaque amorce, à différents jours, pour une quinzaine des souches tests de *Streptococcus thermophilus*. Au total, l'amplification a été réalisée pour les 59 souches étudiées, avec trois répétitions pour chaque souche. Cinq mois plus tard, l'amplification PCR a été répétée avec les trois amorces (6 souches avec chaque amorce).

3.3 L'amplification de l'ADN par PCR:

L'Amplification PCR de l'ADN a été appliquée à 59 souches de *Streptococcus thermophilus* avec les trois amorces (Trois répétitions pour chaque souche).

La réaction RAPD-PCR, pour chaque amorce, a été réalisée dans un volume total de 50 µL contenant ;

Dans le cas de l'amorce XD9; 100 ng de l'DNA bactérien, 1 X de tampon PCR (Fermentas) 3.5 mM de MgCl₂, 200 µM pour chacun des quatre dNTPs (Fermentas), 1 µM d'amorce et 2 U de *Taq* DNA polymerase (Fermentas).

Dans le cas de l'amorce OPI-02 MOD (metabion international AG), 100 ng d' DNA, 1 X de tampon PCR (Fermentas), 2.5 mM de MgCl₂, 200 µM pour chacun des quatre dNTPs (Fermentas), 1 µM de l'amorce et 2.5 de U *Taq* DNA polymerase (Fermentas).

Et enfin avec l'amorce M13 le mélange réactionnel de la PCR contenait; 100 ng d'DNA bactérien, 1 X de tampon PCR (Fermentas), 3 mM de MgCl₂, 200 µM de chacun des quatre dNTPs (Fermentas), 0.2 µM d'amorce et 1 U de *Taq* DNA polymerase (Fermentas).

Les produits de la RAPD-PCR ont été résolus à 90 V dans des gels à 1.5 % (w/v) (Basica LE Prona agarose dans 1XTBE). 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Les gels ont été colorés dans 0.5 mg de Bromure d'Ethidium dissoutes dans 500 ml d'eau distillée pendant 20 min à l'obscurité. Les gels ont été ensuite immergés durant 5 min dans de l'eau distillée pour la décoloration. Les images ont été capturées par Gel Doc XR digital imaging system (Bio-Rad) en utilisant TIFF files.

4. Analyse des profils des souches obtenus par PFGE et RAPD-PCR :

La diversité génétique des souches de *Streptococcus thermophilus*, révélée par la méthode RAPD-PCR avec les primers M13, XD9 et OPI-02MOD et par la méthode PFGE avec les enzymes *ApaI* et *SmaI*, a été interprétée par la réalisation de

dendrogrammes, le calcul de l'indice de diversité de Simpson et la réalisation de la méthode Multidimensional Scaling (MDS).

La corrélation entre les résultats des deux méthodes a été étudiée par le calcul de l'indice Ajusté de Rand et l'indice de Wallace.

4.1 Réalisation des dendrogrammes :

Les photos obtenues, des gels de la PFGE et la RAPD-PCR, ont été inspectées et les bandes ont été détectées visuellement. Les profils résultants de la PFGE et la RAPD-PCR ont été convertis, normalisés et traités par le programme GelCompar II version 6.5 (Applied- Maths, Keijkstraat, Belgique). Ensuite la détection des bandes dans les différents profils a été réalisée par le programme et corrigée manuellement. Les programmes seuls sont généralement insuffisants pour estimer la présence et l'absence de bandes, la vérification visuelle est indispensable (Rementeria *et al.*, 2001 ; Davis *et al.*, 2003).

Le programme a calculé les coefficients de similarité (coefficient de Dice) et regroupé les souches en Dendrogrammes par la méthode UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average).

Des dendrogrammes combinés ont été obtenues par la combinaison des résultats des expériences de la RAPD-PCR avec les différentes amorces M13, XD9, OPI-02 MOD entre eux, par la combinaison des résultats de la PFGE avec les enzymes de restrictions *ApaI* et *SmaI* et enfin la combinaison des résultats de la PFGE et la RAPD-PCR. Ces dendrogrammes combinés ont été réalisés par le programme GelCompar II 6.5 via l'option « average from experiments ».

4.2 Calcul de l'indice de diversité de Simpson :

L'indice de diversité de Simpson (DI) permet de déterminer le pouvoir discriminant des méthodes de typage (Hunter et Gaston, 1988). Il a été calculé pour l'ensemble des expériences de la PFGE et la RAPD-PCR.

$$DI = 1 - 1 / N(N-1) \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

N : Nombre total de souches étudiées.

s : Le nombre total de type déterminé.

n_j : Le nombre de souches contenues dans le type j.

4.3 Calcul de l'indice Ajusté de Rand (Adjusted Rand index) et l'indice de Wallace:

L'indice Ajusté de Rand R (Hubert et Arabie, 1985) et l'indice de Wallace $W_{A \rightarrow B}$ et $W_{B \rightarrow A}$ (Wallace, 1983) ont été calculés (Carrigo *et al.*, 2006). Ces indices sont utilisés pour évaluer la congruence (corrélation) entre les méthodes de typages moléculaires. Ils sont calculés de la manière suivante : en premier un tableau de contingence doit être réalisé ;

Table de contingence, $n_{ij} = |U_i \cap V_j|$

		Partition B				La somme
		V_1	V_2	...	V_C	
Partition A	U_1	n_{11}	n_{12}	...	n_{1C}	a_1
	U_2	n_{21}	n_{22}	...	n_{2C}	a_2
	\vdots	\vdots	\vdots	\ddots	\vdots	\vdots
	U_R	n_{R1}	n_{R2}	...	n_{RC}	a_R
	La somme	b_1	b_2	...	b_C	$\sum_{ij} n_{ij} = N$

V et U ; les groupes de souches différenciés (types de souches) par les deux expériences de typage moléculaire à comparer. N ; le nombre de souches étudiées.

$$R = \frac{\sum_{ij} \binom{n_{ij}}{2} - \left[\sum_i \binom{a_i}{2} \sum_j \binom{b_j}{2} \right] / \binom{N}{2}}{\frac{1}{2} \left[\sum_i \binom{a_i}{2} + \sum_j \binom{b_j}{2} \right] - \left[\sum_i \binom{a_i}{2} \sum_j \binom{b_j}{2} \right] / \binom{N}{2}}$$

$$W_{A \rightarrow B} = \frac{a}{a + b} \quad W_{B \rightarrow A} = \frac{a}{a + C}$$

$$a = \sum_{ij} \binom{n_{ij}}{2} \quad d = \frac{1}{2} (\sum_i n_i^2 - \sum_{ij} n_{ij}^2) \quad C = \frac{1}{2} (\sum_j n_j^2 - \sum_{ij} n_{ij}^2) \quad a + b + C + d = \binom{N}{2}$$

4.4 Application de la Méthode MDS :

La méthode Multidimensional scaling est une autre méthode de regroupement, différente de la méthode UPGMA. Les matrices de similarité (coefficients de DICE), déjà calculées avec le programme GelCompar ont été introduites dans le programme XLXLSTAT 2012 (Addinsoft) afin d'effectuer une analyse des résultats par la méthode MDS.

RÉSULTATS ET DISSCUSION

Dans cette étude deux enzymes de restriction *ApaI* et *SmaI* et trois amorces XD9, M13, OPI-02 MOD ont été utilisées pour l'évaluation de la diversité génétique de 59 souches de *Streptococcus thermophilus* par les deux méthodes génétiques PFGE et RAPD-PCR. Différents paramètres sont utilisés afin d'estimer l'efficacité et le succès d'une méthode de génotypage, incluant, la typabilité, le pouvoir discriminant, la facilité d'interprétation, la faisabilité et la reproductibilité, de préférence après une période de quelques mois (Behringer *et al.*, 2011; Coenye *et al.*, 2002). Dans notre travail ont été évalués la reproductibilité, la typabilité, le pouvoir discriminant et la congruence entre les deux méthodes. L'étude a porté sur le résultat de la PFGE avec chacun des enzymes de restriction, la RAPD-PCR avec chacune des amorces et les combinaisons numériques de ces résultats. Les critères d'interprétation de Tenover *et al.* (1995) ont été appliqués. L'amorce XD9 a montré une mauvaise reproductibilité. C'est pour cela que les combinaisons et la congruence entre PFGE et RAPD-PCR ont été abordées en excluant l'amorce XD9.

1. Reproductibilité des deux méthodes PFGE et RAPD-PCR :

La PFGE est connue pour être une méthode reproductible, par contre, la RAPD-PCR montre des problèmes de répétitivité et de reproductibilité des bandes de ces profils. Quoi qu'il en soit, les méthodes génétiques restent toujours plus reproductibles que les méthodes phénotypiques pour l'identification et la caractérisation des microorganismes.

1.1 Reproductibilité de la méthode RAPD-PCR avec les trois amorces XD9, M13 et OPI-02MOD :

Pour remédier au problème de reproductibilité, les conditions de réalisation de la RAPD-PCR doivent être hautement standardisées (Ramos *et al.*, 2008 ; Singh *et al.*, 2009). Selon les conditions d'expérimentation appliquées, une augmentation de la reproductibilité du résultat de la PCR peut être obtenue (Sanchez *et al.*, 2004) et même 100% de reproductibilité est atteint (Myers *et al.*, 1993 ; Moschetti *et al.*, 1998 ; Payne *et al.*, 1999 ; Venturi *et al.*, 2012).

L'optimisation des conditions de la RAPD-PCR a porté sur les concentrations des composants du mélange réactionnel. Différentes concentrations d'amorces (XD9, M13, OPI-02 MOD), d'ADN et d'enzyme Taq DNA polymerase ont été testées comme il a été précédemment indiqué. A la fin, les concentrations sélectionnées sont celles qui ont données des profils avec des bandes claires, reproductibles et dont l'intensité et le nombre sont les plus élevés.

Le Ratio de la concentration de l'amorce par rapport à la concentration de l'ADN (amorce/ADN) est l'un des facteurs critiques affectant les profils RAPD-PCR et leurs reproductibilités (Davin-Regli *et al.*, 1995 ; Tyler *et al.*, 1997 ; Thangaraj *et al.*, 2011). Dans cette étude, on a déterminé ce ratio, puis la concentration de la Taq DNA polymérase donnant le maximum de bandes dans les profils a été retenu.

1.1.1 Optimisation du protocole de la RAPD-PCR avec l'amorce OPI-02 MOD:

A la concentration fixe de 1 μ M de l'amorce OPI-02MOD, le même résultat est obtenu aux concentrations de l'ADN de 80, 100 et 150 ng (Fig. 15). En plus, les mêmes profils sont générés aux concentrations de 1.3 et 2.5 U de Taq DNA polymerase avec les souches S1-3 et K1-15 de *St. thermophilus*. Par contre, il y a une

augmentation du nombre de bandes détectables de la concentration de 1.3 à 2.5 U de la Taq DNA avec la souche N8-2. Par ailleurs, des profils identiques résultent aux deux concentrations de 2.5 et 3.5 U de Taq DNA polymérase pour les trois souches, à la concentration de 100 ng d'ADN (Résultat non montré). Il en ressort que, les concentrations retenues pour le mélange de la réaction RAPD-PCR optimisée sont 1µM de l'amorce OPI-02 MOD, 100 ng d'ADN et 2.5 U de Taq DNA polymérase.

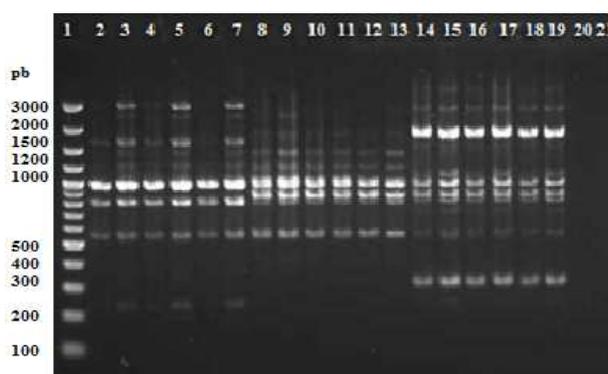


Figure 15: Les profils des souches de *Streptococcus thermophilus* résultants de la RAPD-PCR avec 1µM de l'amorce OPI-02 MOD;

- (1) Marqueur de poids moléculaire (2) La souche N8-2, 80ng d'ADN, 1.3U de Taq DNA polymérase, (3) La souche N8-2, 80ng d'ADN, 2.5 U de Taq DNA polymérase, (4) La souche N8-2, 100 ng d'ADN, 1.3 U de Taq DNA polymérase (5) La souche N8-2, 100 ng d'ADN, 2.5 U de Taq DNA polymérase (6) La souche N8-2, 150 ng d'ADN, 1.3U de Taq DNA polymérase (7) La souche N8-2, 150 ng d'ADN, 2.5 U de Taq DNA polymérase (8) La souche S1-3, 80ng d'ADN, 1.3 U de Taq DNA polymérase (9) La souche S1-3, 80 ng d'ADN, 2.5 U de Taq DNA polymérase (10) La souche S1-3, 100 ng d'ADN, 1.3 U de Taq DNA polymérase (11) La souche S1-3, 100 ng d'ADN (12) , 2.5 U de Taq DNA polymérase (12) La souche S1-3, 150 ng d'ADN, 1.3 U de Taq DNA polymérase (13) La souche S1-3, 150 ng d'ADN, 2.5 U de Taq DNA polymérase (14) La souche K1-15, 80 ng d'ADN, 1.3U de Taq DNA polymérase (15) La souche K1-15, 80 ng d'ADN, 2.5U de Taq DNA polymérase (16) La souche K1-15, 100 ng d'ADN, 1.3 U de Taq DNA polymérase (17) La souche K1-15, 100 ng d'ADN, 2.5U de Taq DNA polymérase (18) La souche K1-15, 150 ng d'ADN, 1.3U de Taq DNA polymérase (19) La souche K1-15, 150 ng d'ADN, 2.5U de Taq DNA polymérase (20) Le contrôle négative, 1.3 U de Taq DNA polymérase (21) contrôle négative, 2.5 U de Taq DNA polymérase.

1.1.2 Optimisation du protocole de la RAPD-PCR avec l'amorce XD9:

Des profils identiques ont été générés avec, la concentration fixe de $1\mu\text{M}$ d'amorce XD9, à la concentration d'ADN de 100 ng et à la concentration de 150 ng, avec une concentration de 2U de Taq DNA polymérase, pour les 5 souches de *Streptococcus thermophilus* testées (Résultat non montré). En plus, l'Amplification de 100 ng d'ADN, donne des profils identiques, aux concentrations de 1.5U et 2U de Taq DNA polymérase (Fig. 16A ; Fig. 16B). Par conséquent, les concentrations retenues pour le mélange de la réaction RAPD-PCR optimisée sont $1\mu\text{M}$ de l'amorceXD9, 100 ng d' DNA et 2 U de Taq DNA polymérase.

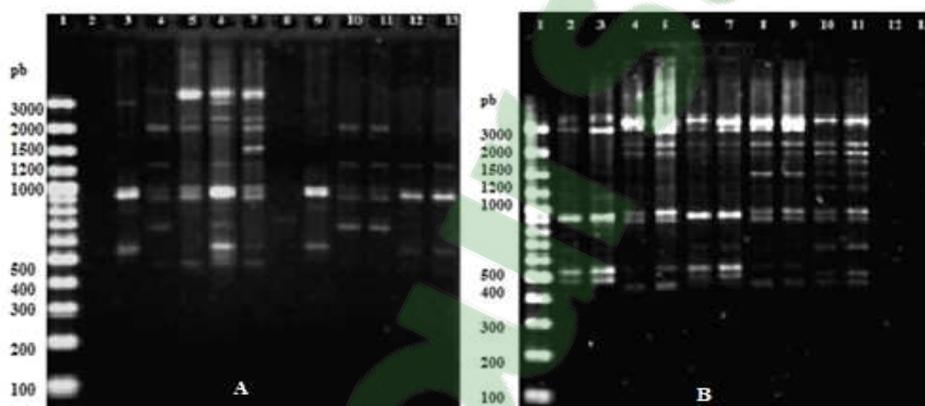


Figure 16: (A) Les profils des souches de *Streptococcus thermophilus* résultants de la RAPD-PCR avec $1\mu\text{M}$ de l'amorce XD9, 100 ng d'ADN, 1.25 U de Taq DNA polymérase (1) marqueur de poids moléculaire (2) contrôle négative (3) la souche 410-3 (4)La souche K1-31 (5) La souche S1-3 (6) La souche K1-15 (7) La souche N4-3 (8) control négative (9) la souche 410-3 (10) La souche K1-31 (11) La souche K1-31 (12) La souche K1-15 (13) La souche K1-15.

(B) Les profils résultant de la RAPD-PCR des souches de *Streptococcus thermophilus* avec $1\mu\text{M}$ d'amorce XD9, 100 ng d'ADN (1) marqueur de poids moléculaire (2) La souche 410-3, 1.5 U de Taq DNA polymérase (3) La souche 410-3, 2 U de Taq DNA polymérase (4) La souche S1-3, 1.5 U de Taq DNA polymérase (5) La souche S1-3, 2 U de Taq DNA polymérase (6) La souche K1-15, 1.5 U de Taq DNA polymérase (7)) La souche K1-15, 2 U de Taq DNA polymérase (8) La souche N4-3, 1.5 U de Taq DNA polymérase (9) La souche N4-3, 2 U de Taq DNA polymérase (10) La souche K1-31, 1.5 U de Taq DNA polymérase (11) La souche K1-31, 2 U de Taq DNA polymérase (12) control négative, 1.5 U de Taq DNA polymérase (13) Contrôle négative , 2 U de Taq DNA polymérase.

1.1.3 Optimisation du protocole de la RAPD-PCR avec l'amorce M13:

Avec l'amorce M13, des bandes amplifiées ont été observées dans les voies des contrôles négatives (Fig. 17A, 18A et 18B) aux valeurs de ratio M13/ ADN de 0.3 μ M/ 100 ng, 0.4 μ M/ 100 ng, 0.5 μ M/ 100 ng et 1 μ M/ 100 ng. Au contraire, au ratio 0.2 μ M / 100 ng, aucune bande n'a été détectée dans le contrôle négative (Fig. 17B). D'autre part, avec toutes les souches testées, des profils RAPD-PCR identiques ont été obtenus aux valeurs de ratio de 0.2 μ M/ 100 ng, 0.3 μ M/ 100 ng et 0.4 μ M/ 100 ng (Fig. 17A, Fig. 17B). Par conséquent, des concentrations de 0.2 μ M d'amorce M13, 100 ng d'ADN et 1U de Taq DNA polymérase ont été choisies comme optimales, puisque aucune bande n'a été détectée dans le contrôle négatif (Fig. 17B). L'utilisation de 1.5U de Taq DNA polymérase, donne le même résultat (données non montrées).

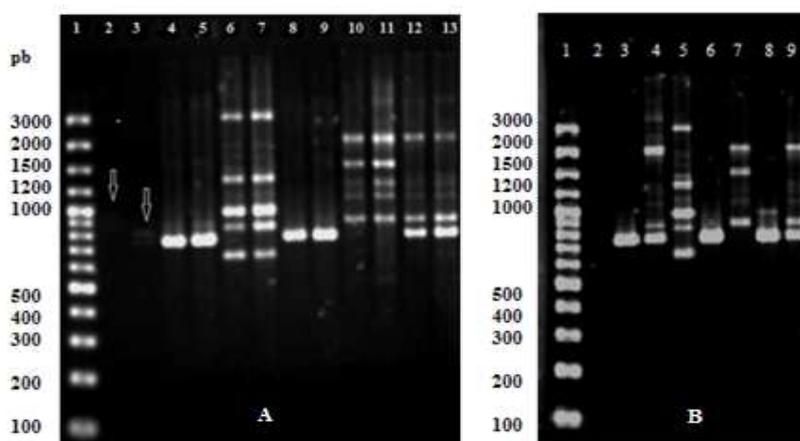


Figure 17: (A) Les profils des souches de *Streptococcus thermophilus* résultants de la RAPD-PCR avec l'amorce M13, 100 ng d'ADN, 1 U de Taq DNA polymérase

(1) marqueur de poids moléculaire (2) contrôle négatif, 0.3 μ M d'amorce (3) contrôle négatif, 0.4 μ M d'amorce (4) La souche K1-7, 0.3 μ M d'amorce (5) La souche K1-7, 0.4 μ M d'amorce (6) La souche N5-4, 0.3 μ M d'amorce (7) La souche N5-4, 0.4 μ M d'amorce (8) La souche K1-1, 0.3 μ M d'amorce (9) La souche K1-1, 0.4 μ M d'amorce (10) La souche S1-3, 0.3 μ M d'amorce (11) La souche S1-3, 0.4 μ M

d'amorce (12) La souche N2-1, 0.3 μ M d'amorce (13) La souche N2-1, 0.4 μ M d'amorce. (B) Les profils résultants de la RAPD-PCR des souches de *Streptococcus thermophilus* avec l'amorce M13, 100 ng d'ADN, 1 U de Taq DNA polymérase, 0.2 μ M d'amorce (1) marqueur de poids moléculaire (2) contrôle négatif (3) La souche K1-7 (4) La souche N2-1 (5) La souche N5-4 (6) La souche K1-1 (7) La souche S1-3 (8) La souche K1-15 (9) La souche N8-2.

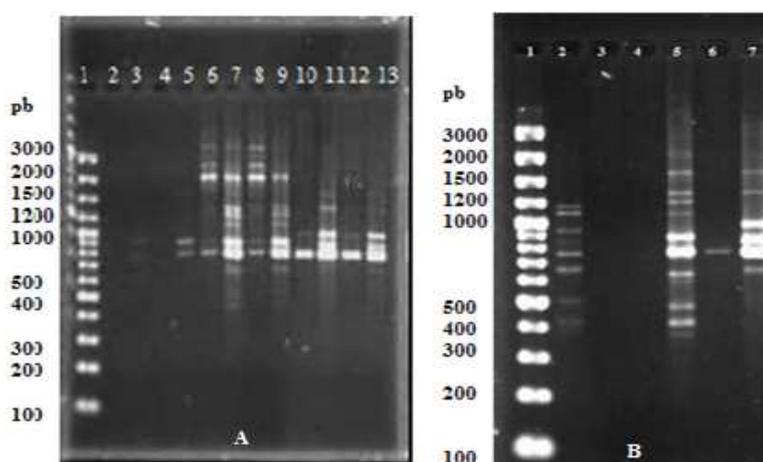


Figure 18: (A) Les profils des souches de *Streptococcus thermophilus* résultants de la RAPD-PCR avec 0.5 μ M de l'amorce M13.

(5) contrôle négative (9) La souche N8-2, (13) La souche K1-15. (B) Les profils résultants de la RAPD-PCR des souches de *Streptococcus thermophilus* avec 1 μ M de l'amorce M13 (2) contrôle négative, (5) La souche N8-2, (7) La souche K1-15.

1.1.4 Reproductibilité des profils RAPD-PCR résultants :

La reproductibilité des bandes des profils, obtenus en utilisant les concentrations sélectionnées suite à l'optimisation, a été confirmée en répétant l'amplification en différents jours, avec les amorces M13, XD9 et OPI-02MOD et la totalité des 59 souches de *Streptococcus thermophilus* de l'étude. Mais cinq mois plus tard, si l'amplification de six souches avec l'amorce OPI-02 MOD a engendré des profils identiques, quatre des six souches testées avec l'amorce M13 ont données le même

résultat et seulement une sur six avec l'amorce XD9. Des bandes supplémentaires, de faibles intensités, ont été détectés sur les profiles (Fig. 19).

Les différentes concentrations des composants testés du mélange de la réaction RAPD-PCR ont eu une influence sur les profiles obtenus et leurs reproductibilités. Dans notre expérience des profiles identiques et constants ont été atteints à certaines concentrations d'ADN et de Taq DNA polymérase comme cela a été le cas dans

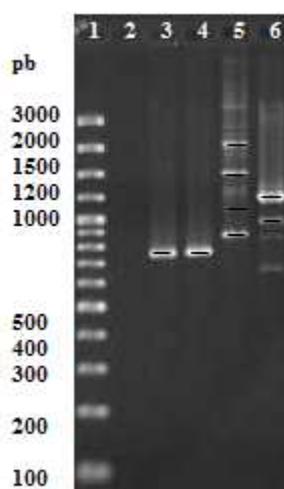


Figure 19: Les profiles des souches de *Streptococcus thermophilus* résultants de la RAPD-PCR avec l'amorce M13, générés cinq mois plus tard.

Les bandes reproductibles sont indiquées avec des traits noirs, le reste sont des bandes supplémentaires telles qu'on peut les observer avec les souches (5) N4-3 et (6) Yo-mix 410-3.

d'autres études (Wolff *et al.*, 1993 ; Fraga *et al.*, 2005 ;Skorić *et al.*, 2012). A des concentrations inférieures de l'ADN ou de la Taq DNA polymérase, soit il n ya pas d'amplification, soit l'intensité et/ou le nombre de bandes détectées est inférieur (Résultat non montré).

Dans ce travail, l'effet de la concentration de l'amorce sur le résultat, a été bien illustré, en particulier avec l'amorce M13. Des profiles identiques ont été obtenus à des valeurs de ratio de 0.2 μ M/ 100 ng à 0.4 μ M/ 100 ng. A une valeur de ratio

inférieure et égal à 0.1 μM / 100 ng, des profils RAPD-PCR différents ont été observés (Résultat non montré). D'autre part, à des valeurs de ratio supérieures et qui sont égales à 0.5 μM / 100 ng et 1 μM / 100 ng, des bandes supplémentaires sont générées. Cela est illustré en comparant les profils de la souche N8-2 dans les figures 17B (voie 9), 18A (voie 9) et 18B (voie 5). Pareil pour la souche K1-15 sur les figures 17B (voie 8), 18A (voie 13) et 18B (voie 7). A des valeurs de ratio amorce/ADN élevé, des sites rares ou inaccessibles peuvent être amplifiés (Davin-Regli *et al.*, 1995). Dans ce cas, les bandes peuvent aussi résulter d'une augmentation des faibles mismatches liant l'amorce à la cible ADN (Caetano-Anolles *et al.*, 1992 ; Tyler *et al.*, 1997). D'autre part, à une valeur élevée de ratio amorce/ADN, une amplification de bandes artefacts dans le contrôle négatif a été aussi mentionnée (William *et al.* 1990). Ce phénomène a été observé aux valeurs de ratio amorce M13/ADN de 0.3 μM / 100 ng, 0.4 μM / 100 ng, 0.5 μM / 100 ng and 1 μM / 100 ng (Fig. 17A, 18A et 18B). Cela peut être dû à un possible contaminant ou un produit non spécifique (primer-dimers) (Pan *et al.*, 1997 ; Raghunathachari *et al.*, 2000; Padmalatha et Prasad, 2006; Harini *et al.*, 2008 ; Singh *et al.*, 2010). La première possibilité est à exclure puisque l'expérience a été refaite avec de nouveaux réactifs et de nouvelles solutions, la seconde possibilité est la plus probable. Une augmentation du nombre de bandes artefacts dans le contrôle négatif et des bandes supplémentaires (souches of N8-2 et K1-15) proportionnelle à la concentration de l'amorce M13 a été observé (Fig. 17A, 18A et 18B). Par conséquent, les bandes supplémentaires générées avec les souches N8-2 et K1-15, à des concentrations élevées d'amorce M13, ne peuvent pas être dues seulement à une amplification de sites rares ou inaccessibles sur l'ADN. Le phénomène de dimérisation de l'amorce (primer-dimers) peut aussi affecter les

profiles RAPD des souches. L'amplification de ce produit non spécifique, en présence d'ADN, a été déjà rapporté (Pan *et al.*, 1997).

Les conditions optimisées ont donné des bandes de profiles RAPD-PCR reproductibles avec les trois amorces OPI-02MOD, M13 et XD9. De telles bandes correspondent à un parfait « annealing » des sites amplifiés avec une bonne efficacité ou des sites qui sont présents en copies multiples sur le génome (Davin-Regli *et al.*, 1995). Quand l'amplification des souches de *Streptococcus thermophilus* a été répétée cinq mois plus tard, des profiles RAPD-PCR identiques ont été générés avec l'amorce OPI-02 MOD. Par ailleurs, quoi que, de faibles bandes supplémentaires sont apparues dans les profiles produits par les amorces XD9 et M13, les bandes reproductibles ont persisté. Ces faibles bandes supplémentaires ne peuvent pas être le résultat d'une contamination ou de la dégradation de l'ADN conservé à -20°C, comme il a été rapporté par Black *et al.* (1992). Ces échantillons d'ADN conservés pendant cinq mois ont reproduit des profiles identiques avec l'amorce OPI-02 MOD, contrairement, aux profiles générés avec l'amorce XD9 avec les mêmes échantillons. En plus, un nouvel ADN extrait de la souche de *Streptococcus thermophilus* LMG 18311 a généré un profile avec une faible bande supplémentaire, avec l'amorce XD9. Il a, par contre, généré des profiles identiques de la souche *Streptococcus thermophilus* LMG 18311 à ceux de cinq mois auparavant avec les amorces OPI-02 MOD et M13. L'étude réalisée par Saunders *et al.* (2001) a démontré que la calibration et la température du Thermocycleur ont un effet important dans la fiabilité et la reproductibilité des profiles de la RAPD-PCR. Les faibles bandes supplémentaire générées dans les profiles, après cinq mois, peuvent être la conséquence d'une faible variation dans température d'annealing ou la calibration du Thermocycleur, donnant une amplification de sites non spécifiques de l'ADN.

On peut conclure que l'amorce OPI-02 MOD semble être la plus reproductible, suivie par M13. L'amorce XD9 est celle qui a montré la plus mauvaise performance. Différents auteurs ont notés que certaines amorces étaient extrêmement fiables tandis que d'autres donnaient des résultats incontestablement inconsistants (Penner *et al.*, 1993 ; Bielawski *et al.*, 1995; Grosberg *et al.*, 1996; Tyler *et al.*, 1997).

Cela peut s'expliquer par la présence d'un nombre élevé de sites de séquences spécifiques à l'amorce OPI-02 MOD sur l'ADN de *Streptococcus thermophilus* comparé au nombre de sites de séquences non spécifiques, ce qui peut avoir un effet important sur sa bonne reproductibilité.

L'un des objectifs de l'optimisation de la RAPD-PCR est d'augmenter la spécificité et l'efficacité de l'interaction amorce-ADN. Un nombre élevé de sites spécifiques par rapport aux sites non spécifiques devrait être en faveur de l'interaction amorce-ADN. Par conséquent, une faible variation de la température ou de la calibration du Thermocycleur, qui peut causer la non reproductibilité intra-laboratoire ou interlaboratoire, de la RAPD-PCR, peut ne pas avoir de conséquence significative sur la reproductibilité pour une telle interaction amorce/ADN (OPI-02 MOD/*Streptococcus thermophilus* DNA). Ramos *et al.* (2008) ont conclu qu'au moins une partie des problèmes de reproductibilité attribués à la RAPD-PCR pourraient être dus à une sélection biaisée des loci et des amorces, et non nécessairement à la technique RAPD-PCR.

Le problème de reproductibilité de la RAPD-PCR peut être, en principe, maîtrisé par un protocole de laboratoire vigoureux et une répétition des tests. L'objectif d'une telle répétition est de retenir les bandes qui persistent entre le premier et le dernier test pour une analyse ultérieure. (Telles et Soares, 2007; Santos *et al.*, 2007). Ramos *et al.*

(2008) ont développé une procédure afin d'optimiser la répétition et de surmonter les erreurs de sélection des loci pour l'analyse génétique des données RAPD-PCR.

L'utilisation d'une amorce comme OPI-02 MOD pour l'étude de la diversité génétique des souches de *Streptococcus thermophilus*, dans différents laboratoires ou à différentes périodes, peut être efficace. Accompagné évidemment, d'une stricte standardisation des conditions de la RAPD-PCR, l'utilisation de la même marque de Taq DNA polymérase, le même modèle de thermocycleur, un contrôle de la température et de la calibration du Thermocycleur.

1.2 Reproductibilité de la méthode PFGE avec les deux enzymes de restrictions *SmaI* et *ApaI* :

Les répétitions réalisées en utilisant les deux enzymes *SmaI* ou *ApaI* ont produits des profils identiques pour chaque culture testée indiquant l'excellente reproductibilité de la méthode. La méthode est connue pour avoir une bonne reproductibilité (Sanchez *et al.*, 2004 ; Ruiz *et al.*, 2008) et, comme dans le cas de nos expériences, des niveaux de 100% de reproductibilité sont atteints (Okatani *et al.*, 2001 ; Rodas *et al.*, 2005 ; Alonso *et al.*, 2005 ;). Rudolph *et al.*, (1998) ont évalués, à différentes périodes, la répétitivité et la stabilité des profils PFGE, des souches de *Streptococcus pneumoniae*, obtenus avec *SmaI* et *ApaI* enzymes avant et après 50 passages in Vitro et tous leurs tests ont donnés des profils identiques (aucun changement n'a été détecté).

Il a été observé, dans le cas de nos souches, au-delà de quatorze mois de conservation des Plug à 4°C, l'ADN de certaines souches montre des signes de dégradation.

1.2.1 Optimisation du résultat des profils PFGE obtenus :

L'extraction de l'ADN et la restriction ont été réalisées essentiellement comme décrit par O'Sullivan et Fitzgerald (1998) avec des modifications pour améliorer la qualité des profils produits :

-Différentes concentrations de Protéinase K de 100 μ g, 500 μ g, 1 mg, 1.5mg et 2mg /ml ont été testées. La proteinase K est appliquée après la lyse cellulaire, elle a un rôle dans l'inactivation des nucléases des suspensions cellulaires comme les RNases et les DNases (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>). On peut voir par exemple une dégradation de l'ADN sur la figure 20, due à l'utilisation d'une concentration insuffisante de 500 μ g/ml de proteinase K.

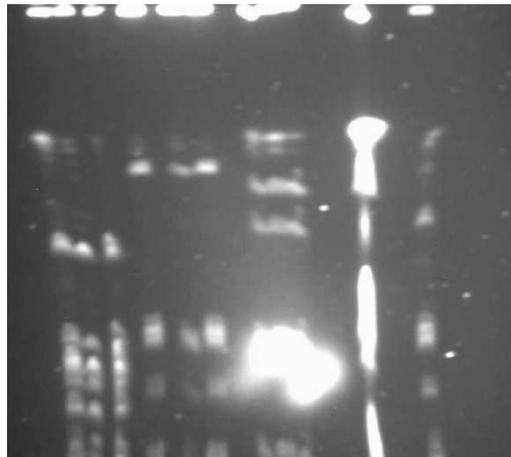


Fig 20: Les profils des souches de *Streptococcus thermophilus* résultants de la PFGE avec l'enzyme *Sma*I. La concentration de la proteinase K est de 500 μ g/ml lors de l'extraction.

- Le lavage des plugs, après l'application de la proteinase K est important afin de l'éliminer. En général, le lavage en ajoutant le phenylmethylsulfonyl fluoride est largement appliqué pour atteindre cet objectif (Somers *et al.*, 2001 ; Ventura et Zink, 2002 ; Simpson *et al.*, 2002). Lorsque se produit concerigène n'est pas disponible plusieurs lavages de Tampon EDTA sont appliqués (O'Sullivan et Fitzgerald, 1998).

Dans notre cas, des lavages, pendant 30 mn dans 50 mM EDTA, 3, 7 et 9 ont été testés afin de résoudre le problème de « Smear » et « Ghost » apparus dans les profils. Ce problème peut être dû à une mauvaise élimination de la protéinase K dans les plugs (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>) engendrant une incomplète restriction. Le résultat de 9 lavages était le meilleur. Pour aussi essayer de résoudre ce problème différentes concentrations d'agarose 1%, 1.2%, 1.5% et de concentrations de Thiourea 50µM, 75µM 100µM ont été testées. 50µM de thiourea a résolu le problème, les autres concentrations n'ont rien apporté de plus.

- une incomplète restriction peut aussi être causée par une faible concentration d'enzyme de restriction. Différentes concentrations d'enzyme *SmaI* et *ApaI* et durées d'incubation ont été essayés, dans cette étude. Comme par exemple dans la figure 21, où on peut voir, que les concentrations de 2, 3 et 5 U d'enzyme *ApaI* étaient insuffisantes pour la digestion complète de l'ADN puisque des bandes épaisses ont résultées.

- Différents temps et durées de pulsation ont été aussi essayés. Les profils PFGE sur la figure 21 illustrent des conditions de pulsations inadéquates. La distance entre les puits et la première bande est grande. Vers le bas des bandes non séparées sont observées.

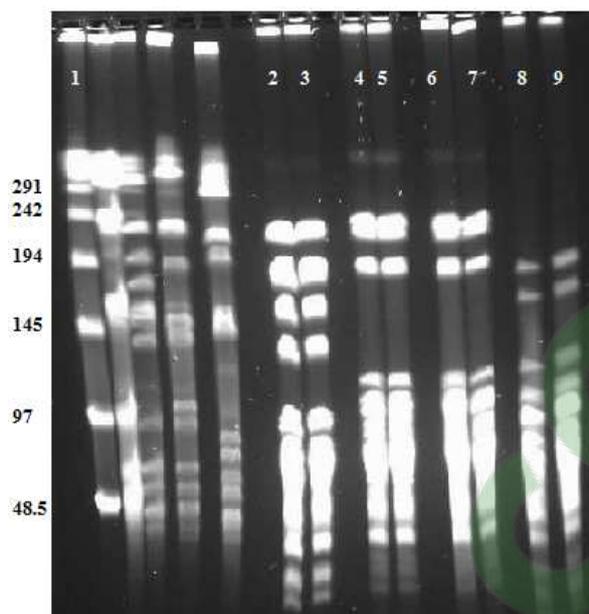


Figure 21: Les profils PFGE des souches de *Streptococcus thermophilus* avec l'enzyme *ApaI* et une durée d'incubation de 15h.

(1) Marqueur de poids moléculaire (2) La souche N2-1, 2U d'enzyme *ApaI*, (3) La souche N2-1, 5U d'enzyme *ApaI*, (4) la souche N5-5, 2U d'enzyme *ApaI*, (5) la souche N5-5, 5U d'enzyme *ApaI*, (6) la souche N5-1, 3U d'enzyme *ApaI*, (7) la souche N5-1, 5U d'enzyme *ApaI*, (8) la souche K1-1, 3U d'enzyme *ApaI*, (9) la souche K1-1, 5U d'enzyme *ApaI*. Temps de pulsation: 7s (6h), 7s (6h), 10s (6h), 15s (5h).

2. Pouvoir discriminant des deux méthodes PFGE et RAPD-PCR :

2.1 Discrimination et typabilité des souches de *St. thermophilus* par PFGE :

Parmi les 59 souches de *Streptococcus thermophilus* analysées par PFGE, cinq (N3-3, N3-6, N3-2, N5-4, N2-4) ont été non typables avec les deux enzymes de restriction *SmaI* et *ApaI* (Fig. 22). l'addition de Thiourea, comme cela a été recommandé par les auteurs (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2003 ; Silbert *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2004), n'a pas résolu le problème, même avec des concentrations de 75µM et 100µM.

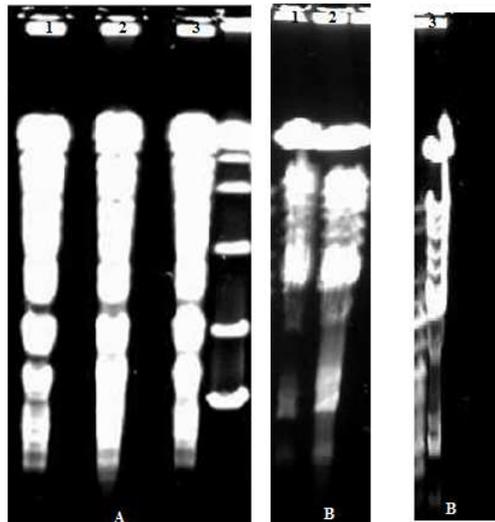


Figure 22: Les profiles PFGE non typeable des souches de *Streptococcus thermophilus* résultants avec (A) l'enzyme *SmaI* (1) N3-3, (2) N5-4 et (3) N3-2 (B) l'enzyme *ApaI* (1) N3-3, (2) N5-4 et (3) N3-2.

La méthode PFGE a discriminé 51 génotypes et 41 génotypes d'une totalité de 54 souches typeables avec, respectivement, les enzymes de restriction *SmaI* et *ApaI* (Fig.28, Fig 29). Les valeurs de l'indice discriminant (l'indice de diversité) DI sont de 0.998 avec l'enzyme *SmaI* et 0.984 avec l'enzyme *ApaI*. Un indice supérieure à 0.90 est souhaitable pour qu'un résultat soit interprété avec confiance et de telles valeurs sont considérées comme adéquates ou robustes pour une méthode de génotypage (Coenye *et al.*, 2002; van Belkum *et al.*, 2007).

La méthode PFGE a produit, avec l'enzyme *SmaI*, des profiles de 10 à 14 bandes (fig. 23) pour la majorité des souches de *St. thermophilus*. Les profiles des souches N9-4, N9-1 and N2-1 ont données 6, 8 et 9 bandes respectivement. Les bandes ont des poids moléculaires entre à peu près 48.5 kb et 339.5 kb.

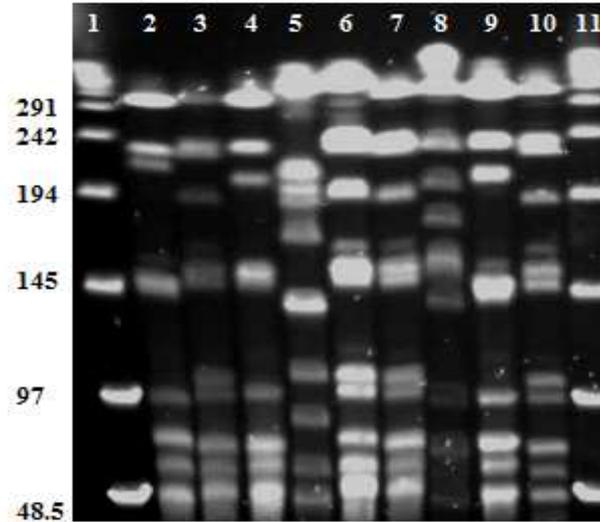


Figure 23: Les profils PFGE des souches de *Streptococcus thermophilus* obtenus avec l'enzyme *SmaI*.

(1) et (11) marqueur de poids moléculaire (2) la souche N5-7 (3) la souche K1-31 (4) la souche S1-3 (5) la souche Ta 040-1 (6) La souche K1-21 (7) la souche K1-14 (8) La souche N6-5 (9) La souche N6-6 (10) La souche K1-15.

La méthode PFGE a produit, avec l'enzyme *ApaI*, des profils de 10 à 18 bandes (Fig. 24). Des bandes, dont les poids moléculaires rangés entre 14.5 kb et 242.5 kb, ont été prises en considération dans cette étude, du fait du grand nombre et la non visibilité des bandes dont le poids est inférieur 14.5 kb.

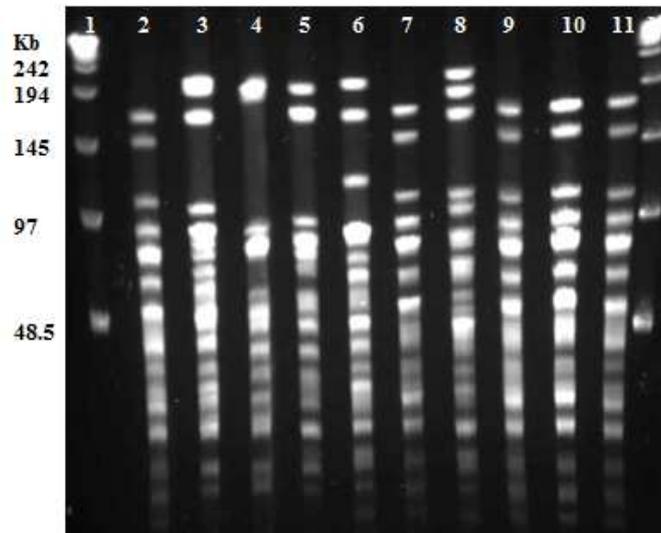


Figure 24: Les profils PFGE des souches de *Streptococcus thermophilus* obtenus avec l'enzyme *ApaI*.

(1) et (12) marqueur de poids moléculaire (2) la souche K1-26 (3) la souche N6-1(4) la souche Ta040-1(5) la souche Yo-mix 410-3 (6) La souche N9-2 (7) la souche K1-9 (8) La souche N4-1 (9) La souche K1-29(10) La souche K1-24 (11) La souche K1-23.

La combinaison des résultats de la PFGE obtenus avec les deux enzymes a discriminé 53 géotypes des 54 souches analysées (Fig. 30) et donc un indice de diversité de 0.999.

Le dendrogramme combiné PFGE (*SmaI*, *ApaI*) a montré seulement, une pair de souches K1-19 et K1-2, dont les profils sont identiques.

2.2 Discrimination et typabilité des souches de *St. thermophilus* par RAPD-PCR :

Les 59 souches ont été typable par la méthode RAPD-PCR et avec les trois amorces testées M13, OPI-02MOD et XD9.

L'amplification avec l'amorce OPI-02 MOD a donné des profils contenant de 5 à 11 bandes entre 300 bp à 3000 bp (fig. 25). L'amorce M13 a généré des profils de 1 à 6

fragments dont les poids moléculaires sont, approximativement, entre 600 à 3000 bp (Fig. 26).

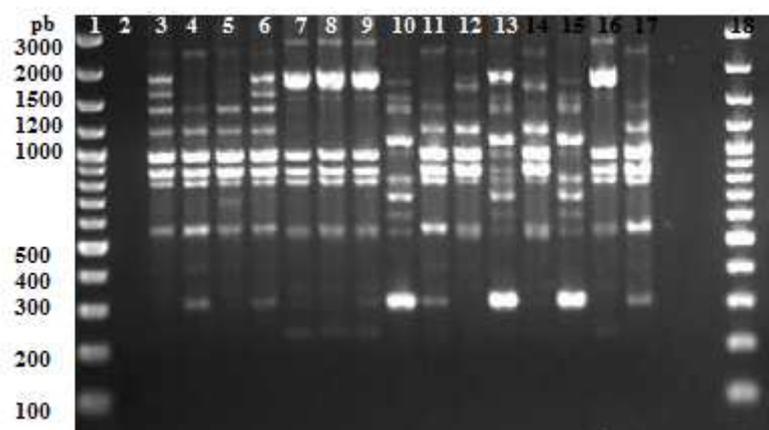


Figure 25: Les profils RAPD-PCR des souches de *Streptococcus thermophilus* obtenus avec l'amorce OPI-02 MOD.

(1) et (18) marqueur de poids moléculaire (2) contrôle négatif (3) la soucheN9-4 (4) la souche , N5-3 (5) la soucheN9-2 (6) La soucheN9-1 (7) la soucheK1-29 (8) La souche K1-16 (9) La souche K1-7 (10) La soucheN3-2 (11) La soucheN5-1 (12) La souche N3-4 (13) La souche K1-20 (14) La souche N6-4(15) La souche Ta040-02 (16) La soucheK1-18(17) La souche N5-6.



Figure 26: Les profils RAPD-PCR des souches de *Streptococcus thermophilus* obtenus avec l'amorce M13.

(1) et (19) marqueur de poids moléculaire (2) contrôle négatif (3) la souche N5-3 (4) la souche , N9-2 (5) la souche N9-1 (6) La souche K1-29 (7) la souche K1-16 (8) La souche N3-2 (9) La souche N5-1 (10) La souche N3-4 (11) La souche K1-20 (12) La souche N6-4 (13) La souche Ta 040-2

(14) La souche K1-18 (15) La souche N5-6 (16) La souche K1-11 (17) La souche N9-4 (18) la souche LMG18311.

L'Amplification avec l'amorce XD9 a généré de 2 à 11 bandes de poids moléculaires, approximativement de 450 pb à plus de 3000pb (une bande de même poids moléculaire supérieur à 3000pb a été détectée dans la majorité des profils) (Fig. 27).

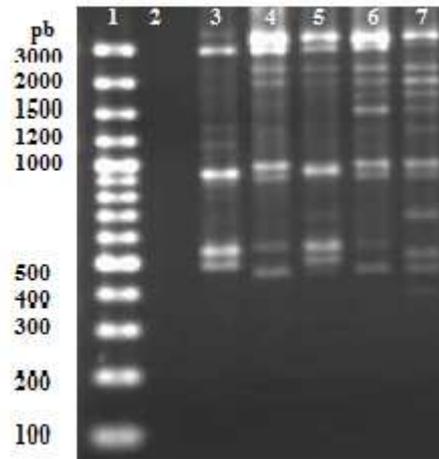


Figure 27: Les profils RAPD-PCR des souches de *Streptococcus thermophilus* obtenus avec l'amorce XD9.

(1) marqueur de poids moléculaire (2) contrôle négatif (3) la souche Yo-mix 410-3 (4) la souche S1-3 (5) la souche K1-15 (6) La souche N4-3 (7) la souche K1-31.

L'analyse RAPD-PCR des 59 souches de *St. thermophilus*, utilisant les amorces OPI-02 MOD, M13 et XD9, a discriminé 38, 24 et 43 génotypes, respectivement. Les valeurs DI étaient de 0,976 pour l'amorce OPI-02 MOD, 0,855 pour l'amorce M13 et 0,986 avec l'amorce XD9.

Quand les souches N3-3, N3-6, N3-2, N5-4, N2-4 non typables par PFGE ont été exclues, l'analyse RAPD-PCR avec les amorces OPI-02 MOD, M13 et XD9 a discriminé 36, 19 et 41 génotypes respectivement (Fig. 31 ; Fig. 32 ; Fig. 35). Les valeurs de l'indice de diversité DI étaient de 0,973 avec l'amorce OPI-02 MOD, 0,826 avec l'amorce M13 et 0,983 avec l'amorce XD9. La méthode RAPD-PCR utilisant

l'amorce M13 a donné le plus faible pouvoir discriminant de cette étude, tandis qu'un indice de diversité supérieur à 0.90 a été obtenu de l'analyse RAPD-PCR des souches de *St. thermophilus* avec les amorces XD9 et OPI-02MOD.

La combinaison des résultats des deux amorces M13, OPI-02MOD a produit 38 génotypes avec un DI de 0.976 (Fig. 33). Les souches K1-19 et K1-2 ont le même génotype avec le dendrogramme combiné PFGE (*SmaI*, *ApaI*). Ce résultat a été confirmé avec les deux méthodes RAPD-PCR (OPI-02MOD) et RAPD-PCR (M13). Le dendrogramme combiné RAPD-PCR (M13, OPI-02MOD) a révélé huit génotypes (contenant plus d'une seule souche). Toutes les souches de *St. thermophilus* appartenant à ces génotypes ont été différenciées par l'analyse combiné PFGE (*SmaI*, *ApaI*) (Fig. 30).

Les souches Ta 040-1 et Ta040-2, provenant du même ferment commercial, sont identiques selon le résultat de la RAPD (M13) (Fig. 32). Toutes les autres expériences PFGE et RAPD-PCR ont révélées des profils différents de ces deux souches.

Contrairement au résultat de la RAPD (M13), le profil de *St. thermophilus* LMG18311 n'a été similaire à celui d'aucune autre souche de *St. thermophilus* étudiée, selon les résultats de RAPD-PCR (OPI-02MOD), PFGE (*SmaI*) et PFGE (*ApaI*) (Fig. 28 ; Fig. 29 ; Fig. 31).

53 génotypes ont été distingués des 54 souches de *St. thermophilus* en combinant les résultats PFGE-RAPD (*SmaI*, *ApaI*, M13, OPI-02MOD) (DI= 0.999) (Fig. 34).

En accord avec ce qui a été déjà rapporté, (Ruiz *et al.*, 2008; Sanchez *et al.*, 2004; Jenkins *et al.*,2002), la combinaison des résultats des méthodes PFGE (avec les deux

enzymes de restriction) et la RAPD-PCR (avec les deux amorces M13, OPI-02MOD) a augmentée le niveau de discrimination des souches de *St. thermophilus*, comparé à chaque résultat pris séparément.

Le résultat de la combinaison PFGE-RAPD (*Sma*I, *Apa*I, M13, OPI-02MOD) a été aussi discriminant que celui de PFGE (*Sma*I, *Apa*I).

Dans notre cas, la méthode PFGE est plus discriminante que la RAPD-PCR pour le génotypage et l'étude de la diversité génétique des souches de *St. thermophilus*, comme cela a été mentionné par les auteurs (Moschetti *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 2002 ; Sanchez *et al.*, 2004; Rodas *et al.*, 2005)

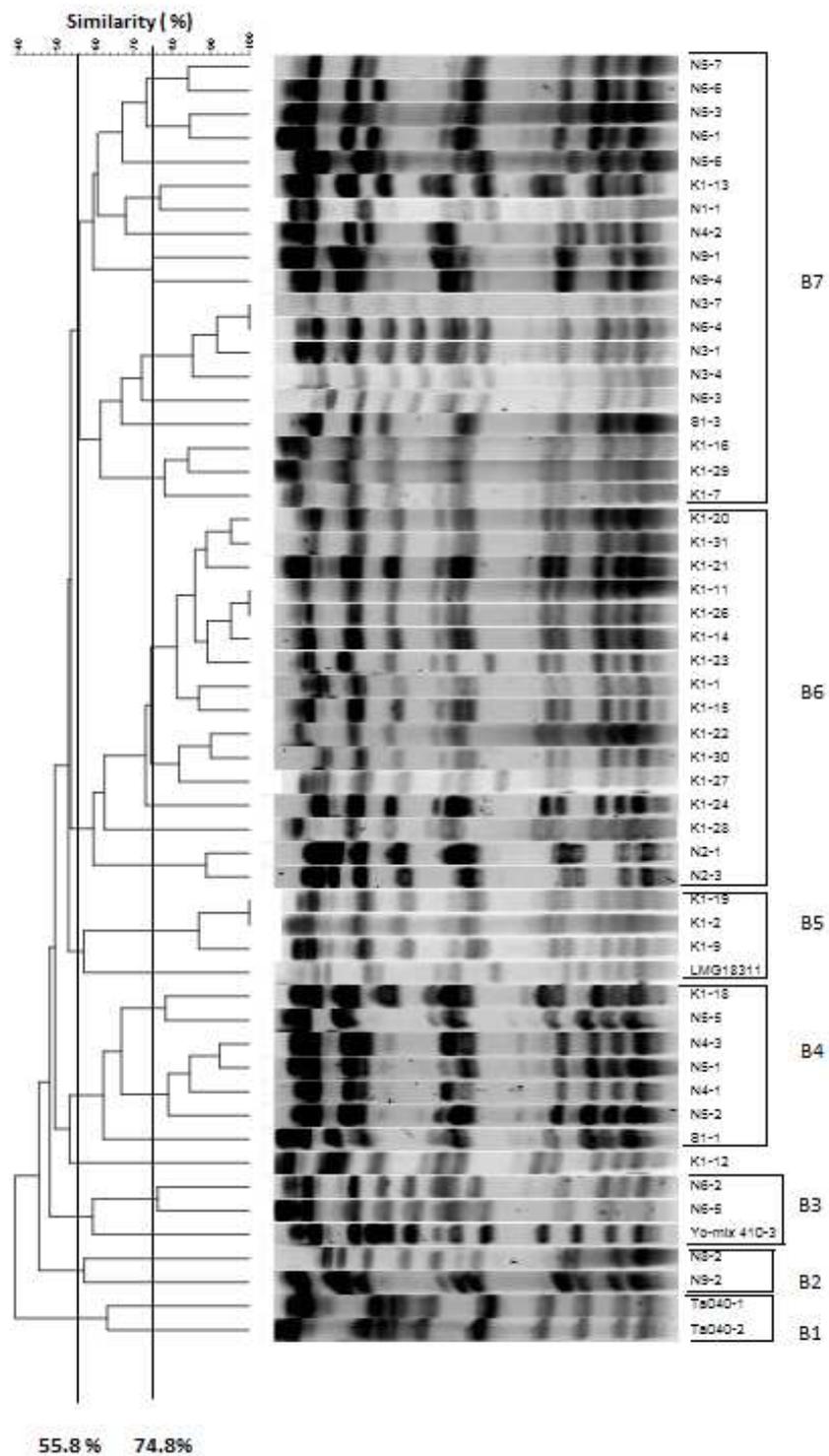


Figure 28 : Dendrogramme du résultat de la PFGE avec l'enzyme *Sma*I.

B1, B2, B3, B4, B5, B6 et B7 ; clusters au coefficient de similarité de Dice de 55.8%.

74.8% ; coefficient de similarité de Dice délimitant les clusters selon les critères de Tenover *et al.* (1995).

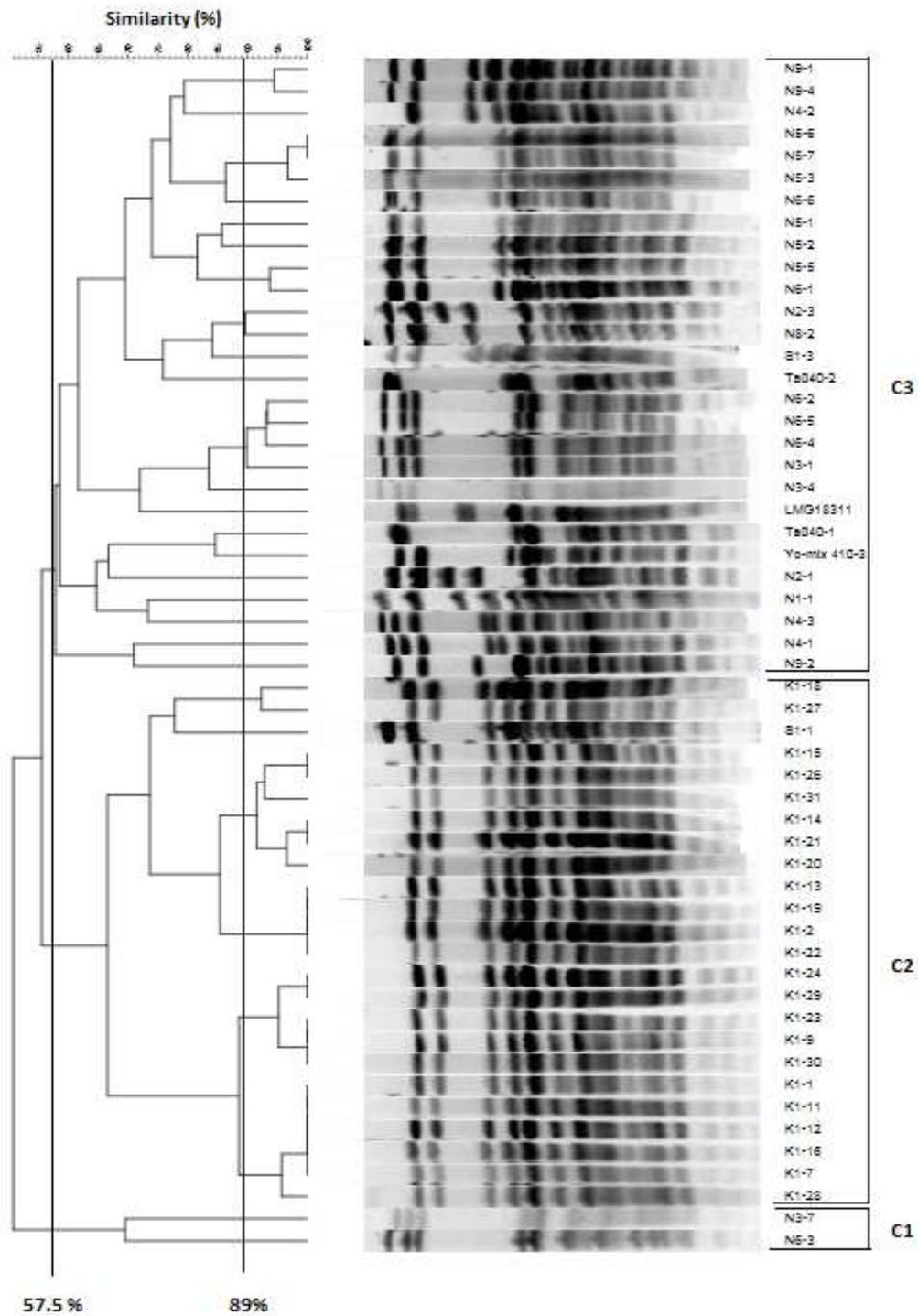


Figure 29 : Dendrogramme du résultat de la PFGE avec l'enzyme *ApaI*.

C1, C2 et C3 ; clusters déterminés au coefficient de similarité de Dice de 57.5%.

89% ; coefficient de similarité de Dice délimitant les clusters selon les critères de Tenover *et al.* (1995).

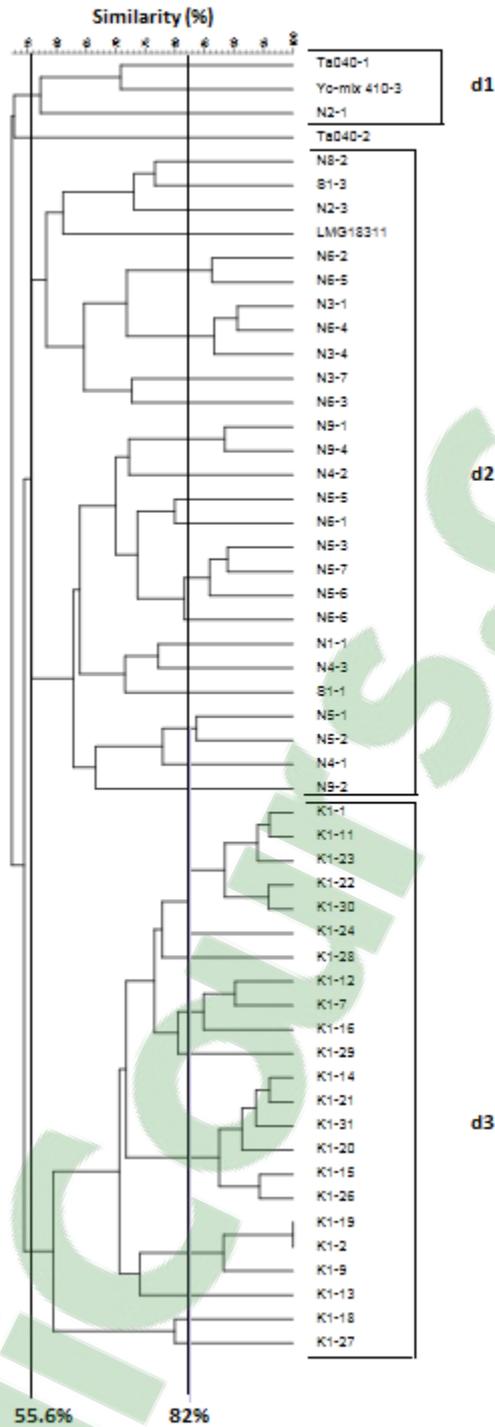


Figure 30 : Dendrogramme combiné PFGE (*SmaI*, *ApaI*).

d1, d2 et d3 ; clusters déterminés au coefficient de similarité de Dice de 55.6 %.

82% ; coefficient de similarité de Dice délimitant les clusters selon les critères de Tenover *et al.* (1995).

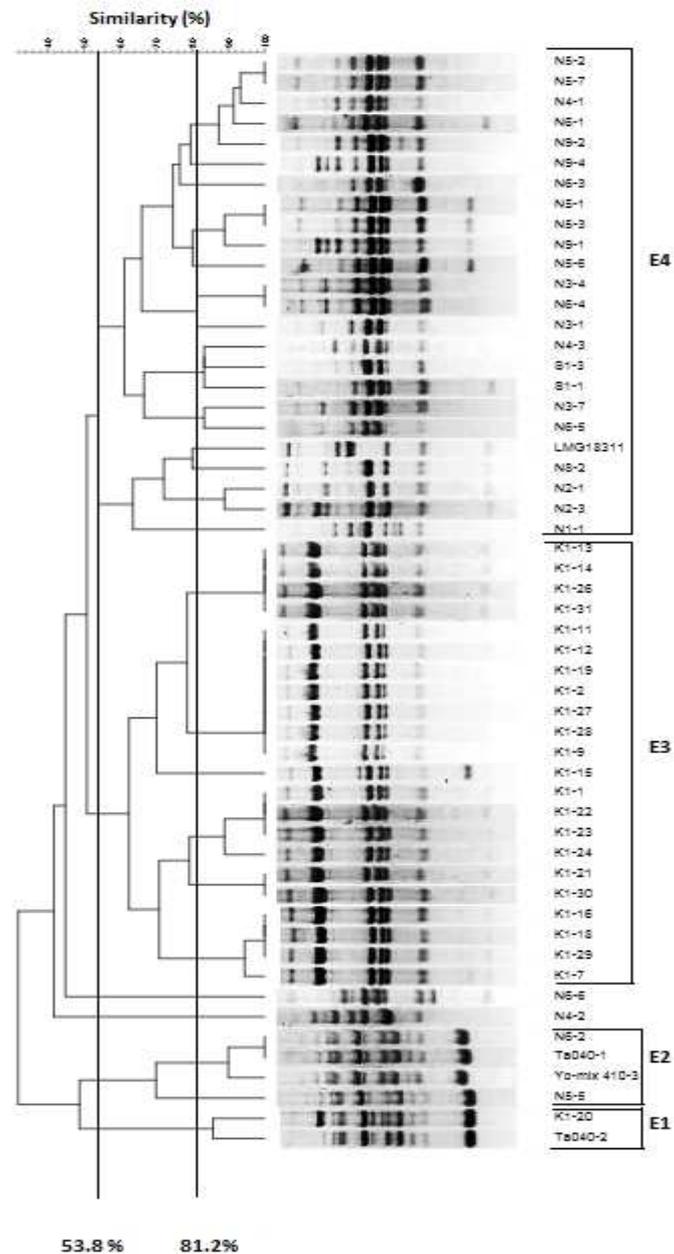


Figure 31 : Dendrogramme du résultat de la RAPD-PCR avec l'amorce OPI-02MOD.

E1, E2, E3 et E4 ; clusters déterminés au coefficient de similarité de Dice de 53.8%.

81.2% ; coefficient de similarité de Dice délimitant des clusters selon les critères de Tenover *et al.* (1995).

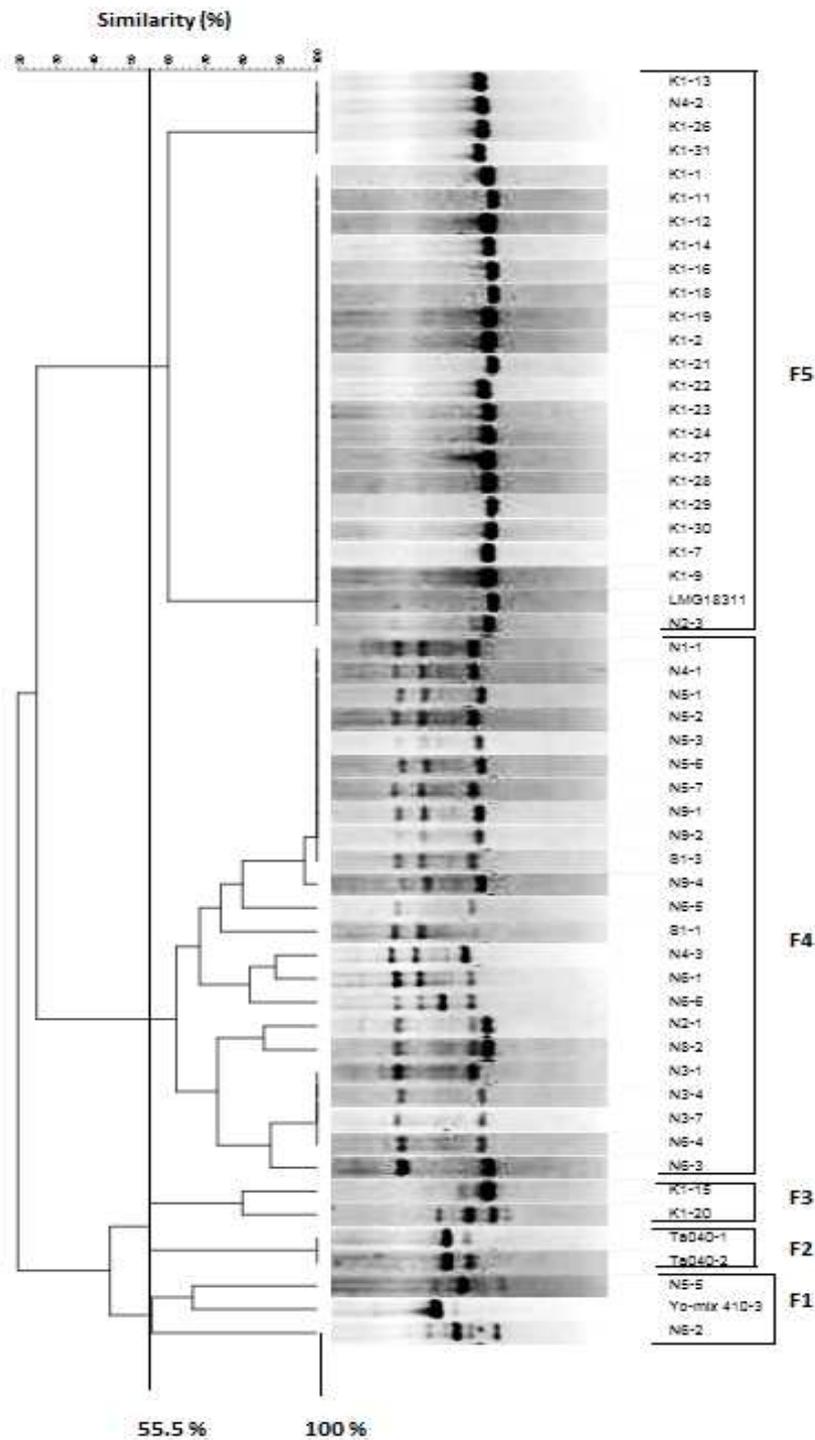


Figure 32 : Dendrogramme du résultat de la RAPD-PCR avec l'amorce M13.

F1, F2, F3, F4 et F5; clusters déterminés au coefficient de similarité de Dice de 55.5%.
100% ; coefficient de similarité de Dice délimitant des clusters selon les critères de Tenover
et al. (1995).

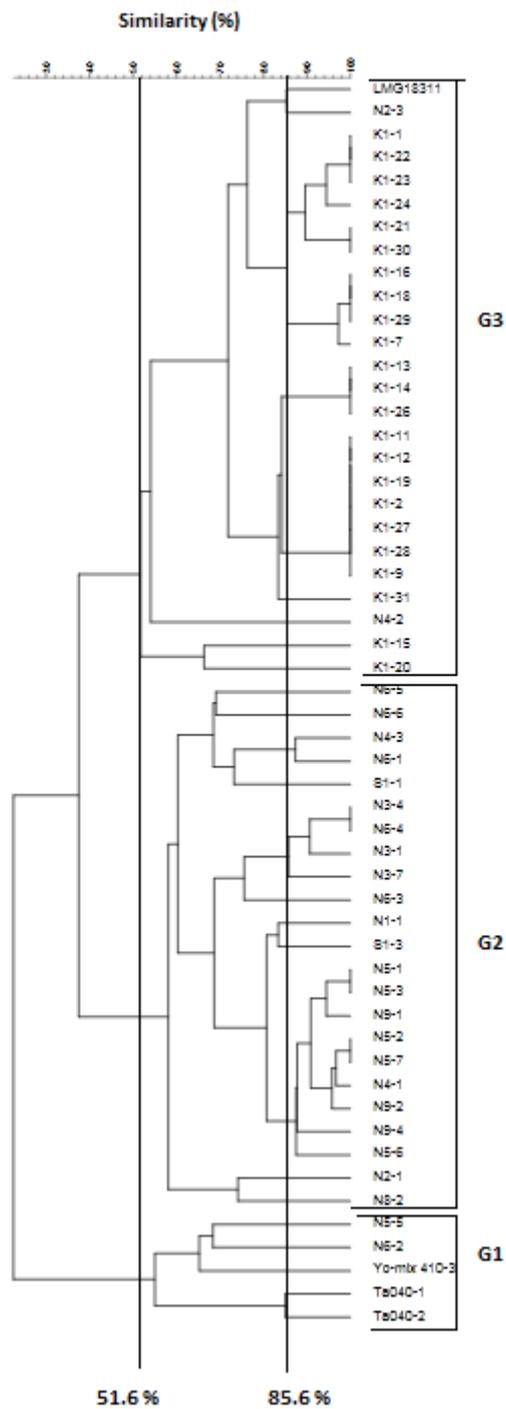


Figure 33 : Dendrogramme combiné RAPD-PCR (OPI-02MOD, M13).

G1, G2 et G3 ; clusters déterminés au coefficient de similarité de Dice de 51.6 %.

85,6% ; coefficient de similarité de Dice délimitant les clusters selon les critères de Tenover *et al.* (1995).

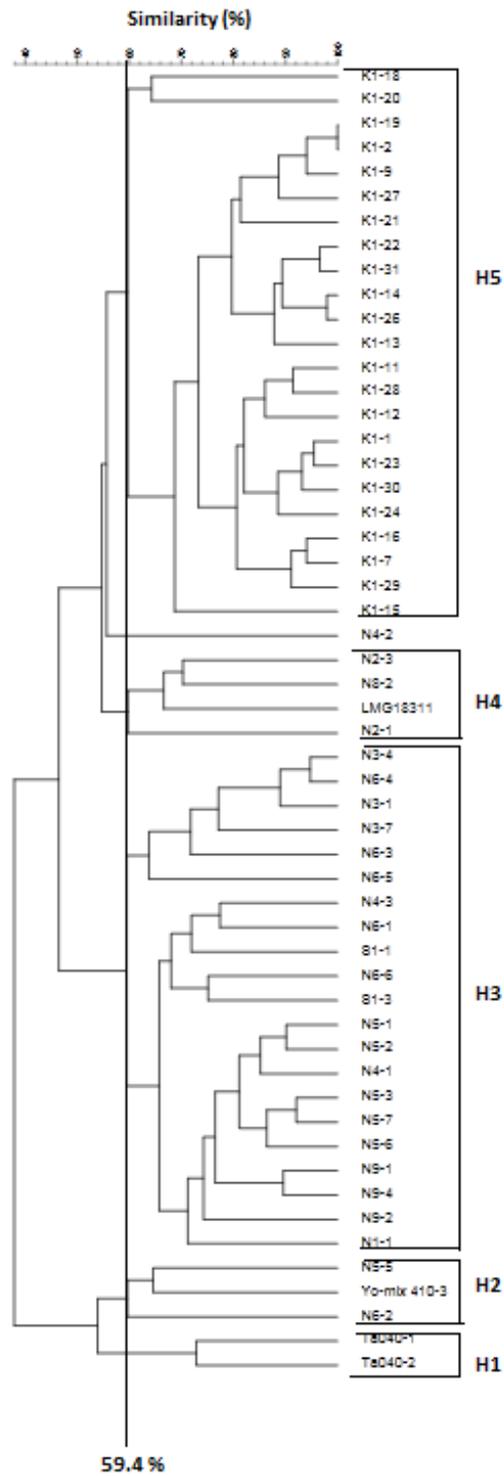


Figure 34 : Dendrogramme combiné PFGE-RAPD-PCR (*SmaI*, *ApaI*, OPI-02MOD, M13).

H1, H2, H3, H4 et H5 clusters déterminés au coefficient de similarité de Dice de 59.4 %.

3. Interprétation des résultats des dendrogrammes :

3.1 L'application des critères de Tenover *et al.* (1995):

Dans un but de déterminer la diversité génétique (et les relations de clonalité) des souches de *Streptococcus thermophilus*, telle que révélée par la PFGE, des clusters ont été déterminés à des coefficients de similarité de Dice de 74.8% et 89% pour le dendrogramme de PFGE (*SmaI*) et celui de PFGE (*ApaI*), respectivement (Tab. 4, Fig. 28, Fig. 29). Ces valeurs de coefficients ont été déduites selon les critères de Tenover *et al.* (1995), largement utilisés pour l'interprétation des profils de la PFGE en épidémiologie (Coenye *et al.*, 2002; Murchan *et al.*, 2003; Carriço *et al.*, 2006). Par conséquent, des valeurs de coefficients de similarité de 74.8% pour le dendrogramme de PFGE (*SmaI*) et 89% pour le dendrogramme PFGE (*ApaI*) sont des valeurs minimales déterminant des clusters regroupant des souches de *St. thermophilus* qui ne sont différentes que par un nombre de bandes inférieur ou égal à six. Une moyenne de 82% a été utilisée pour le dendrogramme combiné PFGE (*ApaI*, *SmaI*) (Fig. 30).

Des critères similaires à ceux de Tenover *et al.* (1995) pour l'interprétation du résultat de la RAPD-PCR n'existent pas dans la littérature. Des valeurs de coefficients de similarité équivalentes de 100%, 81.2% et 85.6% ont été retenues pour les dendrogrammes RAPD(M13), RAPD (OPI-02 MOD) et RAPD (M13, OPI-02MOD) respectivement, afin de comparer leurs clusters avec ceux des dendrogrammes résultants des expériences PFGE (Fig. 31, Fig. 32, Fig. 33). Ce sont des valeurs de coefficient de similarité minimales qui ont été choisies pour inclure les clusters semblables à ceux des expériences de PFGE (ou cluster contenant au moins une partie des souches du cluster PFGE). Les souches contenues dans ces clusters sont représentées dans le tableau 4.

Les souches de *St. thermophilus* Ta040-1, Ta040-2 et Yo-mix 410-3 isolées de ferment Danisco (Tab.3) ont révélées des profils PFGE différents de plus de six bandes avec la PFGE (*SmaI*), PFGE (*ApaI*) et même PFGE (*SmaI*, *ApaI*). Cela veut dire qu'elles sont génétiquement différentes selon les critères de Tenover *et al.* (1995). Ce fait a été confirmé par le résultat de la RAPD-PCR (OPI-02MOD) et le résultat de l'analyse combinée RAPD-PCR (M13, OPI-02MOD).

D'après les résultats de la PFGE (*SmaI*) et la PFGE (*ApaI*) la souche *St. thermophilus* LMG 18311 ne semble être génétiquement liée à aucune de nos souches selon les critères de Tenover *et al.* (1995). Ce qui a été aussi confirmé par le résultat de la RAPD-PCR (OPI-02MOD) et celui de la RAPD-PCR (M13, OPI-02MOD).

Les souches de *St. thermophilus* N3-1 et N3-4 du yaourt N3 et la souche N6-4 du yaourt N6 sont groupées dans le cluster AS6 du dendrogramme combiné PFGE (*SmaI*, *ApaI*) et le cluster R6 du dendrogramme combiné RAPD-PCR (M13, OPI-02MOD) (Tab. 4). Ce résultat signifie qu'elles sont probablement génétiquement liées, quoiqu'elles proviennent de régions différentes (Antalya, Mersin) (Tab. 3). Tous les clusters AS1, AS2, AS3, AS4, AS5, AS7, AS8, AS9 excepté le AS6 (Tab. 4, Fig 30) regroupent à l'intérieur d'eux, seulement des souches provenant du même échantillon de yaourt. Quatre clusters ont été déterminés pour les souches de l'échantillon de yaourt K, 2 clusters pour l'échantillon de yaourt N5, un cluster pour le yaourt N6 et un cluster pour le yaourt N9 (Tab. 3, Tab. 4). D'autres souches de *St. thermophilus* de ces échantillons de yaourt n'ont pas été groupées dans des clusters,

Elles sont restées seules. Pareil pour les souches des yaourts S1, N2, N3, N4 et des ferments commerciaux qui n'ont pas été groupées en clusters.

La majorité des clusters obtenus par les dendrogrammes PFGE (*SmaI*) et PFGE (*ApaI*) et dont les souches sont considérées comme probablement de la même lignée, selon les critères de Tenover *et al.* (1995) rassemblent des souches d'un même échantillon. Tandis que, tous les clusters du dendrogramme combinée PFGE (*SmaI*, *ApaI*), excépté un, contiennent des souches d'un même échantillon. Ce dernier résultat semble plus cohérent.

Les souches des échantillons de yaourts S1, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N8 et N9 ont été groupées, par les dendrogrammes PFGE (*SmaI*) ou PFGE (*ApaI*), dans des clusters parmi lesquels S2, S4, S6, S12, A5, A9 et A10 contiennent des souches provenant de différents échantillons (Tab. 3, Tab. 4). Une partie de ces souches n'a pas été groupé dans des clusters. Les clusters R4, R5 et R6 résultant du dendrogramme RAPD-PCR (M13, OPI-02 MOD), sont composés de mélange de souches provenant des échantillons de yaourts N3, N4, N5, N6 et N9.

Les souches des yaourts S1, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N8 (des régions de Mersin et Antalya)semble être génétiquement liée entre elles et génétiquement éloignées de celles de l'échantillon de yaourt K (de la région deKemah éloignée des deux premières)

Une hétérogénéité génétique des souches de *St. thermophilus* dans un même échantillon de yaourt, ressort de l'étude des clusters aux coefficients de similarité déterminés selon les critères de Tenover *et al.* (1995) pour la PFGE et leurs équivalents par la RAPD-PCR. Il en résulte, différents RAPD ou pulsotypes.

Tableau 4: Clusters obtenus, à des coefficients de similarité de Dice, selon les critères de Tenover *et al.*, à partir des dendrogrammes de PFGE et leurs équivalents pour les dendrogrammes de RAPD-PCR.

Strains designation	PFGE SmaI 74.8 %	PFGE ApaI 89%	PFGE SmaI+ ApaI 82%	RAPD M13 100%	RAPD OPI- O2MOD 81.2 %	RAPD OPI-02 MOD + M13 85.6 %
K1-14	S1	A1	AS1	M2	O1	R1
K1-15	S1	A1	AS1	*	*	*
K1-26	S1	A1	AS1	M1	O1	R1
K1-21	S1	A1	AS1	M2	O13	R2
K1-31	S1	A1	AS1	M1	O1	*
K1-20	S1	A1	AS1	*	O12	*
K1-1	S1	A2	AS2	M2	O2	R2
K1-11	S1	A2	AS2	M2	O3	R3
K1-23	S1	A8	AS2	M2	O2	R2
N5-7	S2	A6	AS4	M3	O9	R5
N6-6	S2	*	*	*	*	*
K1-19	S3	A3	AS3	M2	O3	R3
K1-2	S3	A3	AS3	M2	O3	R3
K1-9	S3	A8	AS3	M2	O3	R3
N5-3	S4	A6	AS4	M3	O7	R5
N6-1	S4	A10	*	*	O9	R4
N6-2	S5	A5	AS5	*	O11	*
N6-5	S5	A5	AS5	*	O5	*
N6-4	S6	A5	AS6	M4	O6	R6
N3-1	S6	A5	AS6	M4	O6	R6
N3-4	S6	*	AS6	M4	O6	R6
N3-7	S6	*	*	M4	O5	R6
K1-13	S13	A3	*	M1	O1	R1
N1-1	S13	*	*	M3	*	*
K1-16	S8	A2	AS8	M2	O8	R7
K1-29	S8	A8	*	M2	O8	R7
K1-7	S8	A2	AS8	M2	O8	R7
K1-22	S9	A3	AS2	M2	O2	R2
K1-30	S9	A8	AS2	M2	O13	R2
K1-27	S9	A4	*	M2	O3	R3
N2-3	S10	A9	*	M2	O4	*
N2-1	S10	*	*	*	O4	*
K1-18	S11	A4	*	M2	O8	R7
N5-5	S11	A10	*	*	*	*
N4-3	S12	*	*	*	O10	R4
N5-1	S12	A4	AS9	M3	O7	R5
N4-1	S12	*	*	M3	O9	R5
N5-2	S12	*	AS9	M3	O9	R5
K1-12	*	A2	AS8	M2	O3	R3
K1-28	*	A2	*	M2	O3	R3
N8-2	*	A9	*	*	*	*
N5-6	*	A6	AS4	M3	*	R5
N9-4	S7	A7	AS7	*	*	R5
N9-1	S7	A7	AS7	M3	O7	R5
K1-24	*	A8	*	M2	O2	R2
N4-2	*	*	*	M1	*	*
N6-3	*	*	*	*	*	*
S1-3	*	*	*	M3	O10	*
LMG18311	*	*	*	M2	*	*
S1-1	*	*	*	*	O10	*
N9-2	*	*	*	M3	O9	R5
Yo-mix410-3	*	*	*	*	O11	*
Ta040-1	*	*	*	M5	O11	*
Ta040-2	*	*	*	M5	O12	*

S, A clusters résultant des dendrogrammes de PFGE. M, O clusters générés des dendrogrammes de la RAPD-PCR. AS, clusters générés de l'analyse combinée des résultats de la PFGE avec les enzymes *SmaI* et *ApaI*. R, clusters générés de l'analyse combinée des résultats de la RAPD-PCR avec les amorces M13, OPI-02MOD. *souches seules non groupées avec d'autres souches.

de *St. thermophilus* peuvent résider en association dans le même yaourt, la même observation a été reporté par Rizzotti *et al.*, (2009) dans le fromage. Cela peut vouloir dire que la fermentation n'est pas réalisée par un seul génotype de *St. thermophilus*.

3.2 Clusters (ou groupes) produits de la totalité du dendrogramme :

La détermination des clusters de la PFGE et de la RAPD-PCR s'est faite à des valeurs minimales de coefficients de Dice comme suit ; 55.8 % pour PFGE (*SmaI*), 57.5 % pour PFGE (*ApaI*), 55.6 % pour PFGE (*SmaI*, *ApaI*), 53,8 % pour RAPD-PCR (OPI-02 MOD), 55.5 % pour RAPD-PCR (M13), 51.6 % pour RAPD-PCR (M13, OPI-02MOD) et 59.4 % pour l'analyse combinée PFGE-RAPD (*SmaI*, *ApaI*, M13, OPI-02MOD) dendrogrammes (Fig. 28 ; Fig. 29 ; Fig. 30 ; Fig. 31 ; Fig.32 ; Fig. 33 et Fig. 34).

Les souches isolées de l'échantillon de yaourt K, de la région de Kemah sont, en général, groupées en un seul cluster (C2, d1, E3, F5, G3, H5) selon le résultat des différents dendrogrammes. D'autre part, les souches provenant des échantillons de yaourts des régions d'Antalya et de Mersin ont été groupées ensemble dans des clusters communs (C3, d2, E4, F4, G2, H3) (Tab.3), bien séparées des clusters contenant les souches de l'échantillon de yaourt K. puisque Antalya et Mersin sont situées l'une à coté de l'autre et sont loin de la région de Kemah, les deux méthodes (PFGE et RAPD-PCR) ont bien séparées les souches selon leur origine géographique. Dans tous les dendrogrammes, excépté celui de PFGE (*ApaI*), les souches des ferments commerciaux, Ta040-1, Ta040-2 et Yo-mix 410-3 n'ont pas été incluses dans les clusters cités au dessus, probablement, à cause de leur origine géographique différente de celle des autres souches de *St. thermophilus* étudiées. Par contre, la

souche *St. thermophilus* LMG 18311 a été incluse soit dans les clusters des souches de l'échantillon K yoghurt ou les clusters des souches des autres échantillons (Fig.28, Fig. 29 ; Fig. 30 ; Fig. 31 ; Fig. 32 ; Fig. 33 et Fig. 34).

3.3 Congruence entre les Résultats de la PFGE et la RAPD-PCR via l'indice Ajusté de Rand et l'indice de Wallace :

Si une certaine congruence est trouvée entre deux méthodes de typage cela signifie une plus grande confiance dans le résultat et une meilleure caractérisation des souches de *St. thermophilus*.

Les indices Ajustés de Rand et les indices de Wallace obtenus à partir de la comparaison des clusters déterminés selon les critères de Tenover *et al.*, (1995) pour la méthode PFGE et leur équivalents pour la méthode RAPD-PCR étaient très bas (Tab. 5 ; Tab. 6). Ce qui indique la faible corrélation entre les deux méthodes comparées à ces niveaux de coefficients de similarité de Dice. La meilleure correspondance était entre le résultat de l'analyse combinée PFGE (*SmaI*, *ApaI*) et le résultat de l'analyse combinée RAPD-PCR (M13, OPI-02MOD) avec une valeur d'indice Ajusté de Rand de 0.314.

Au contraire, la comparaison des clusters produits de la totalité du dendrogramme, a montré une bonne corrélation entre les deux méthodes (Tab.7 ; Tab.8) avec des valeurs d'indice Ajusté de Rand de 0.609 et 0.787. Une valeur élevée, de 0.69, a été obtenue entre RAPD-PCR (M13, OPI-02MOD) et PFGE (*SmaI*, *ApaI*) par rapport aux valeurs obtenues en comparant les résultats de la RAPD (OPI-02MOD) ou de la RAPD (M13) avec ceux de la PFGE (*ApaI*) ou de la PFGE (*SmaI*). Cela reflète une augmentation de la congruence entre les deux méthodes suite à la combinaison numérique des résultats. Quoique la corrélation était faible, la même chose a été

constatée en comparant les deux méthodes PFGE et RAPD-PCR en appliquant les critères de Tenover *et al.* (1995).

Tableau 5: Les valeurs de l'indice Ajusté de Rand, obtenues par la comparaison des deux méthodes PFGE et RAPD-PCR, en appliquant les critères de Tenover *et al.* (1995).

	RAPD	PFGE	RAPD	RAPD	PFGE	PFGE
	(OPI-02MOD, M13)	(SmaI, ApaI)	(M13)	(OPI-02MOD)	(ApaI)	(SmaI)
RAPD(OPI-02MOD,M13)	1					
PFGE(SmaI,ApaI)	0.314	1				
RAPD(M13)		0.160	1			
RAPD(OPI-02MOD)		0.263	0.26	1		
PFGE(ApaI)	0.176		0.173	0.123	1	
PFGE(SmaI)	0.234		0.123	0.196	0.312	1

Tableau 6: Les valeurs de l'indice de Wallace, obtenues par la comparaison des deux méthodes PFGE et RAPD-PCR, en appliquant les critères de Tenover *et al.* (1995).

	RAPD	PFGE	RAPD	RAPD	PFGE	PFGE
	(OPI-02MOD, M13)	(SmaI, ApaI)	(M13)	(OPI-02MOD)	(ApaI)	(SmaI)
RAPD(OPI-02MOD,M13)	1	0.258			0.157	0.236
PFGE(SmaI,ApaI)	0.017	1	0.025	0.012		
RAPD(M13)		0.120	1	0.197	0.141	0.117
RAPD(OPI-02MOD)		0.246	0.040	1	0.166	0.234
PFGE(ApaI)	0.010		0.029	0.07	1	0.015
PFGE(SmaI)	0.016		0.024	0.011	0.330	1

Tableau 7: Les valeurs de l'indice Ajusté de Rand, obtenues de la comparaison des Clusters produits de la totalité du dendrogramme, pour les deux méthodes PFGE et RAPD-PCR.

	RAPD (OPI-02MOD, M13)	PFGE (<i>SmaI</i> , <i>ApaI</i>)	RAPD (M13)	RAPD (OPI-02MOD)	PFGE (<i>ApaI</i>)	PFGE (<i>SmaI</i>)
RAPD (OPI-02MOD, M13)	1					
PFGE (<i>SmaI</i>, <i>ApaI</i>)	0.69	1				
RAPD (M13)		0.64	1			
RAPD (OPI-02MOD)		0.787	0.762	1		
PFGE (<i>ApaI</i>)	0.533		0.47	0.609	1	
PFGE (<i>SmaI</i>)	0.28		0.25	0.20	0.144	1

Tableau 8: Les valeurs de l'indice de Wallace obtenues, de la comparaison des Clusters produits de la totalité du dendrogramme, pour les deux méthodes PFGE et RAPD-PCR.

	RAPD (OPI-02MOD, M13)	PFGE (<i>SmaI</i> , <i>ApaI</i>)	RAPD (M13)	RAPD (OPI-02MOD)	PFGE (<i>ApaI</i>)	PFGE (<i>SmaI</i>)
RAPD (OPI-02MOD, M13)	1	0.403			0.777	0.382
PFGE (<i>SmaI</i>, <i>ApaI</i>)	0.805	1	0.735	0.80		
RAPD (M13)		0.377	1	0.833	0.766	0.372
RAPD (OPI-02MOD)		0.38	0.35	1	0.871	0.346
PFGE (<i>ApaI</i>)	0.415		0.386	0.387	1	0.232
PFGE (<i>SmaI</i>)	0.232		0.205	0.187	0.607	1

Clicours.COM

La faible corrélation entre les résultats des deux méthodes, exprimée par les faibles valeurs de l'indice Ajusté de Rand, peut être due au fait que les bases moléculaires sur lesquelles reposent les deux méthodes sont différentes (Samore *et al.*, 1997). La différence est probablement due à la différence dans l'exploration du polymorphisme de l'ADN, qui se fait au niveau de la totalité de l'ADN avec la méthode PFGE comparé à des régions plus petites amplifiées par les amorces de la RAPD-PCR. De plus, les événements génétiques, comprenant les mutations, insertions et délétions qui peuvent altérer les profils PFGE (Tenover *et al.* 1995; Barrett *et al.*, 2006) n'altèrent pas nécessairement les profils RAPD-PCR. L'usage de plusieurs enzymes ou amorces permet l'exploration d'une plus large portion du génome, ce qui peut expliquer l'augmentation de la corrélation entre les deux méthodes PFGE et RAPD-PCR, dans les cas de la combinaison numérique des résultats. Il est intéressant de noter que, dans le cas de l'étude des clusters produits par la totalité du dendrogramme, la meilleure valeur de l'indice Ajusté de Rand était de 0.787 entre le résultat de la RAPD-PCR (OPI-02MOD) et l'analyse combinée PFGE (*SmaI*, *ApaI*). Dans le cas de l'application des critères de Tenover *et al.* (1995), la seconde valeur la plus élevée est de 0.263 entre l'analyse combinée PFGE (*SmaI*, *ApaI*) et la RAPD-PCR (OPI-02MOD) (Tab. 5; Tab. 7).

L'indice de Wallace fournit plus d'information ; si on considère PFGE (*SmaI*, *ApaI*) comme le standard de comparaison, la valeur de l'indice de Wallace de 0.805 (Tab.8), signifie que si deux souches sont dans le même cluster du dendrogramme PFGE (*SmaI*, *ApaI*), Elles ont une probabilité de 80.5% d'avoir le même type de RAPD (M13, OPI-02MOD) (le même type veut dire appartenir au même cluster). A

l'opposé, la probabilité que deux isolats partageant le même type de RAPD (M13, OPI-O2MOD) d'avoir le même type PFGE (*SmaI*, *ApaI*) est seulement de 40.3%.

Une robuste correspondance a été observée des types PFGE (*SmaI*, *ApaI*) en direction des types RAPD-PCR avec les amorces OPI-02MOD, M13 et la combinaison (OPI-02MOD, M13) (Tab. 8). Au contraire, une faible correspondance a été détectée des types RAPD-PCR en direction des types PFGE (*SmaI*, *ApaI*). Une faible congruence a été aussi décelée des types PFGE (*SmaI*) ou PFGE (*ApaI*) en direction des types RAPD-PCR (Tab. 8). L'analyse combinée PFGE (*SmaI*, *ApaI*) a été un bon prédicateur des clusters RAPD-PCR.

La combinaison des Résultats des expériences de la PFGE (avec les différents enzymes de restrictions) et celles de la RAPD-PCR (avec les différentes amorces) a augmenté le pouvoir discriminant et la congruence entre les deux méthodes. La combinaison des résultats de la PFGE a aussi augmenté sa capacité à prédire les types RAPD-PCR. Une congruence entre les résultats des méthodes de typage suggère qu'un signal phylogénétique a été en fait, récupéré par les données de typage par les différentes méthodes (Carriço *et al.*, 2006).

3.3.1 Interprétation des résultats des dendrogrammes en incluant l'amorce XD9 :

L'amorce XD9 a montré une reproductibilité médiocre quand l'expérience a été répétée cinq mois plus tard. Elle a aussi montrée une mauvaise congruence en l'incluant dans l'étude (Fig. 35).

En appliquant les critères de Tenover *et al.* (1995), la valeur de l'indice de Rand Ajusté était de 0.254 entre les résultats du dendrogramme combiné RAPD-PCR

(XD9, M13, OPI-02MOD) et du dendrogramme combiné PFGE (*SmaI*, *ApaI*). Par contre, une valeur supérieure de 0.314 a été obtenue entre la RAPD-PCR (OPI-02MOD, M13) et PFGE (*SmaI*, *ApaI*) (Tab. 5). Des valeurs d'indice de Rand Ajusté de 0.039, 0,022 et 0.058 ont résultés entre la RAPD-PCR (XD9) et PFGE (*SmaI*, *ApaI*), PFGE (*ApaI*) et PFGE (*SmaI*), respectivement. Elles sont très faibles comparées à celles avec les amorces OPI-02MOD et M13 (Tab.5).

Pareil observations ont été constatées dans le cas de l'étude des clusters de la totalité du Dendrogramme. La valeur de l'indice de Rand Ajusté était de 0.60 entre les résultats du dendrogramme combiné RAPD-PCR (XD9, M13, OPI-02MOD) et du dendrogramme combiné PFGE (*SmaI*, *ApaI*). Une valeur supérieure de 0,69 a été obtenue entre la RAPD-PCR (OPI-02MOD, M13) et PFGE (*SmaI*, *ApaI*) (Tab. 7). Des valeurs d'indice de Rand Ajusté de 0.036 ; -0.0042 et 0.076 ont résultés entre la RAPD-PCR (XD9) et PFGE (*SmaI*, *ApaI*), PFGE (*ApaI*) et PFGE (*SmaI*), respectivement, indiquant une médiocre congruence entre la RAPD(XD9) et la PFGE avec *SmaI*, *ApaI* et la combinaison. XD9 semble être une mauvaise amorce pour le typage des souches de *St. thermophilus*.

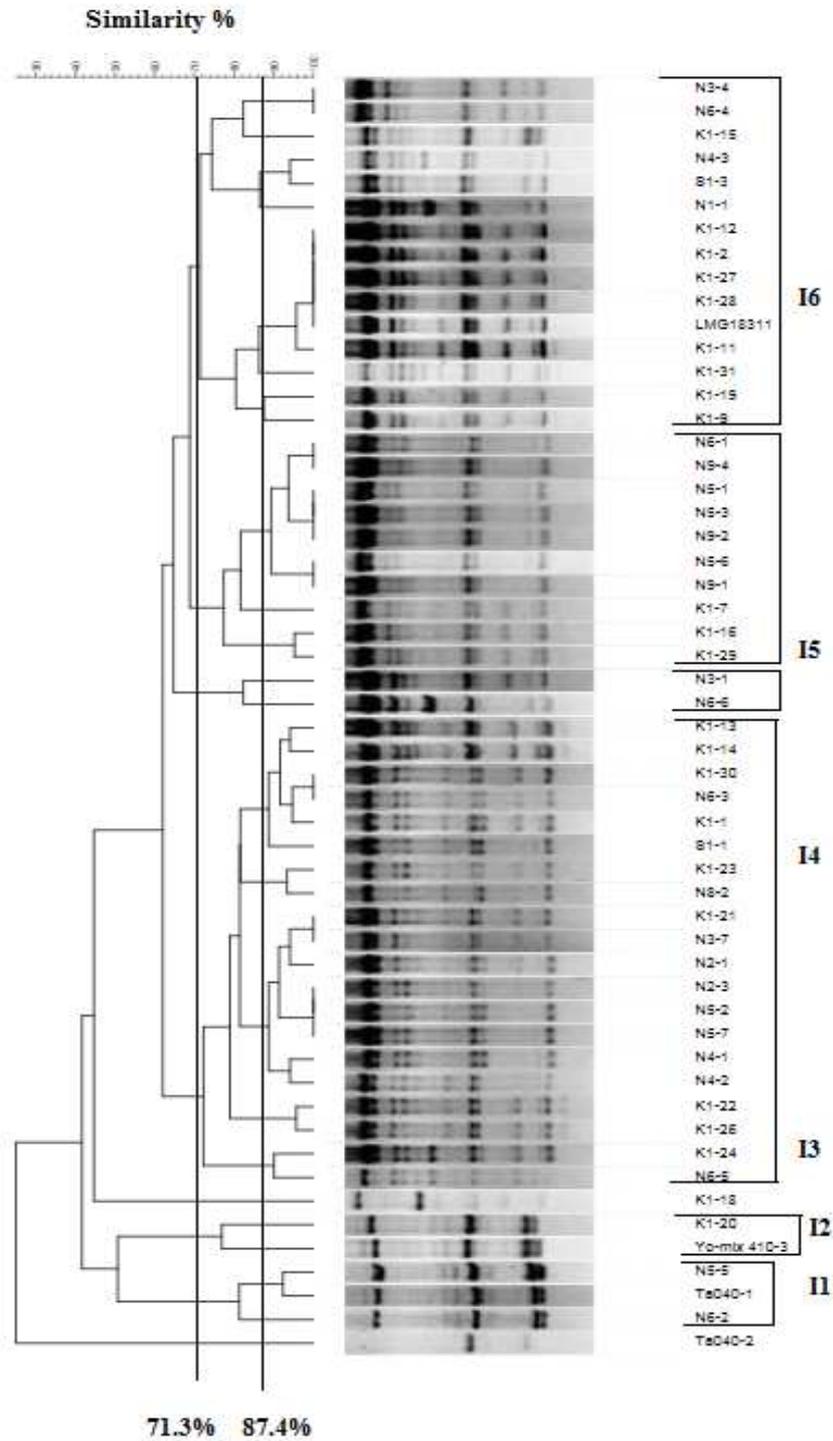


Figure 35: Dendrogramme du résultat de la RAPD-PCR avec l'amorce XD9.

I1, I2, I3, I4, I5 et I6 ; clusters déterminés au coefficient de similarité de Dice de 71.3%.
 87.4% ; coefficient de similarité de Dice délimitant des clusters selon les critères de Tenover
et al. (1995).

4. Analyse des résultats par la méthode MDS:

Cette analyse a été appliquée à toutes les expériences de PFGE, RAPD-PCR et les combinaisons des résultats. L'illustration des résultats de cette analyse a été réalisé, dans cette partie en choisissant quelques exemples des figures 36, 37, 38 et 39.

L'analyse MDS a été appliquée aux souches de *Streptococcus thermophilus* et aux bactéries lactiques afin de visualiser la diversité génétique comme révélée par la méthode RAPD-PCR (Oguntoyinbo et Narbad, 2012 ; Giraffaet *al.*, 2001).

En dépit du fait que les souches révélées comme proches génétiquement par la méthode UPGMA n'étaient pas toujours proches selon la méthode MDS, la tendance générale a été confirmée. Les souches isolées des yaourts de Mersin et Antalya sont génétiquement proches et bien séparées des souches isolées du yaourt de Kemah. De plus, une plus grande dispersion des premières a été constatée, par rapport, aux souches du yaourt K dont les distances sont plus rapprochées comme illustré sur les figures 36, 37, 38 et 39.

A part les souches du yaourt K, En général, les autres souches ne sont pas toujours regroupées selon leur provenance d'un même échantillon, confirmant l'hétérogénéité génétique des isolats d'un échantillon de yaourt.

Les souches de *St. thermophilus* Ta040-1, Ta040-2 et Yo-mix 410-3 se sont révélées ne pas être identiques selon les deux méthodes UPGMA et MDS. Contrairement au résultat de la méthode UPGMA, le résultat de la RAPD (M13) via la méthode MDS a montré que les souches Ta040-1 et Ta040-2 n'étaient pas identiques (Fig. 32; Fig. 36).

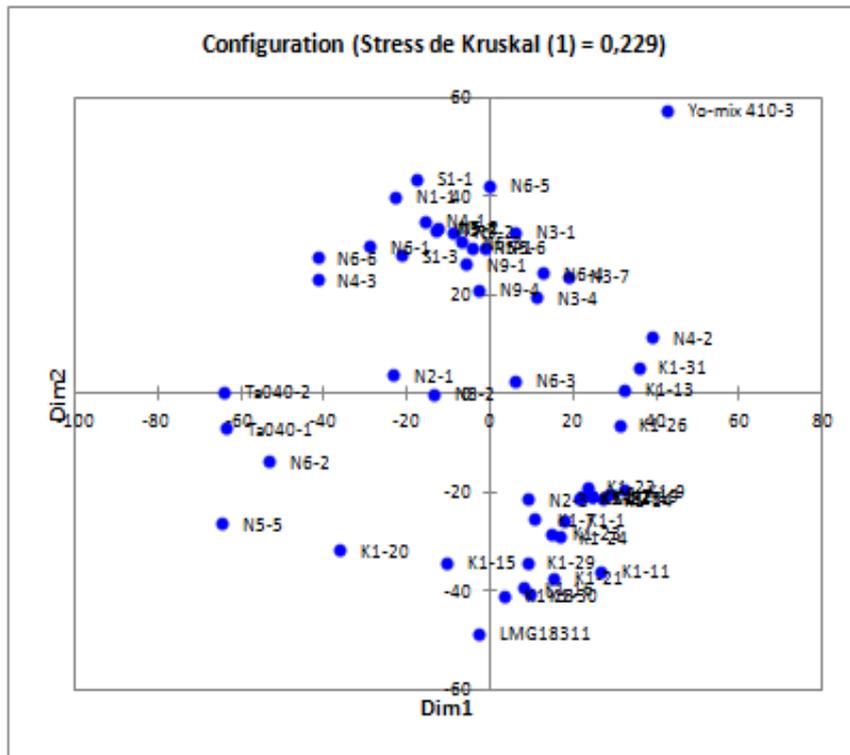


Figure 37: Représentation en deux dimensions obtenue par la technique MDS de la relation génétique entre les souches de *St. thermophilus* selon le résultat de la RAPD-PCR (OPI-02 MOD, M13).

La position de *Streptococcus thermophilus* LMG18311, comme montré par l'analyse combinée PFGE (*SmaI*, *ApaI*), a été au milieu entre le groupe des souches isolées des yaourts de Mersin et Antalya et le groupe des souches du yaourt K (Kemah). Avec la méthode UPGMA, elle a été incluse dans le cluster d2 avec les souches des yaourts de Mersin et Antalya (Fig. 30; Fig. 38).

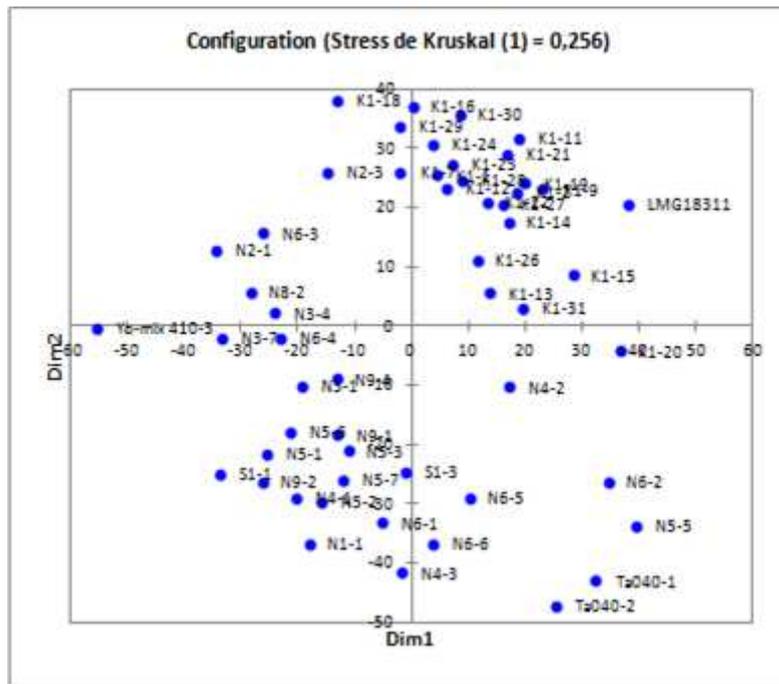


Figure 39: Représentation en deux dimensions obtenue par la technique MDS de la relation génétique entre les souches de *St. thermophilus* selon le résultat de la PFGE-RAPD-PCR (*Sma*I, *Apa*I, OPI-02MOD, M13).

Le résultat de la MDS a confirmé que le choix des valeurs des coefficients de similarités pour l'étude de la totalité du dendrogramme a permis une comparaison acceptable. MDS a permis une meilleure visualisation de cette comparaison comme cela a été déjà rapporté par Giraffa *et al.* (2001).

5. Conclusion:

Les méthodes génétiques de typages ; la PFGE (avec les enzymes de restriction *Sma*I et *Apa*I) et la RAPD-PCR (avec les amorces OPI-02 MOD et M13) ont donné des résultats intéressants dans l'étude de la diversité génétique et le typage des souches de *Streptococcus thermophilus* isolées de yaourts.

Les deux methods ont montré un degré élevé dans la diversité génomique au niveau des souches de l'espèce *St. thermophilus* comme cela a été constaté (Giraffa *et al.* 2001; Mora *et al.* 2002; Andrighetto *et al.* 2002; Jenkins *et al.*, 2002; Michaylova *et al.* 2007, Tosi *et al.*, 2007; Blaiotta *et al.*, 2011; Morandi et Brasca 2012). Ce fait a été illustré par les pourcentages totaux de similarité des dendrogrammes de, 39.3 %, 50.8 %, 52.4 %, 31.9 %, 19.6 %, 22.5 %, and 37.9 %, et l'usage des critères de Tenover *et al.* (1995) (Fig. 28 ; Fig. 29 ; Fig.30 ; Fig.31 ; Fig.32 ; Fig.33 et Fig.34)

La PFGE (*Sma*I), PFGE (*Apa*I), RAPD-PCR (OPI-02 MOD) ont montré une bonne reproductibilité et un bon pouvoir discriminant dans le typage des souches de *Streptococcus thermophilus*. Quoique, cinq des cinquante neuf souches aient été non typables par la PFGE (*Sma*I) et la PFGE (*Apa*I), elles ont été toutes typables par la RAPD-PCR (OPI-02 MOD). La combinaison numérique des résultats de différentes amorces et/ou différents enzymes de restrictions semble être plus efficace puisque une augmentation du pouvoir discriminant et de la congruence entre les deux méthodes a été constatée. Comme cela a été déjà mentionné, des différences ont été observées dans la capacité des différentes amorces et enzymes de restriction à détecter le polymorphisme de l'ADN chez les souches bactériennes. L'efficacité d'un typage par l'usage de plusieurs amorces ou enzymes de restriction, suivi d'une analyse numérique de la combinaison des profils, dans le cas des deux méthodes la RAPD-PCR et la PFGE, et a été constaté (Sanchez *et al.*, 2004, Simpson *et al.*, 2002, Ruiz *et al.*, 2008). L'application de PFGE avec au moins deux enzymes de restriction est recommandée par Jenkins *et coll.* (2002) pour une meilleure différenciation des souches. Davis *et coll.* (2003) ont indiqué que plus de six enzymes de restriction

Clicours.COM

seraient nécessaire pour estimer raisonnablement les relations génétiques entre les souches de *Escherichia coli* O157:H7.

L'amorce OPI-O2 MOD a montré la meilleure performance et donc semble la plus appropriée pour le typage des souches de *St. thermophilus*, suivie de l'amorce M13.

L'amorce XD9 a montré la pire performance.

PFGE est sans doute la technique la plus laborieuse et qui prend beaucoup de temps, l'utilisation de la RAPD-PCR, même avec plusieurs amorces est toujours moins coûteux, plus facile et plus rapide à exécuter. Il en ressort que la réalisation de la RAPD-PCR avec l'amorce OPI-O2 MOD combinée avec d'autres amorces, bien choisies, (l'amorce XD9 est à exclure) peut être utile et fiable dans le typage et l'évaluation de la diversité génétique, particulièrement, d'un grand nombre de nouveaux isolats de *St. thermophilus*. L'augmentation de la capacité de la RAPD-PCR à prédire la PFGE peut aussi être un objectif à atteindre dans une telle combinaison.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Accolas J.P., Veaux M. et Auclair J.** 1971. Etude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles et mésophiles, en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite. *Lait*. 51 : 249-272.
- Allem R., Elkebir F.Z. et Guetarni H.** 2007. Effet des bactéries lactiques sur *Helicobacter pylori* in vitro. *Méd Nut.* 43(3): 121-127.
- Alonso R., Martín A., Peláez T., Marín M., Rodríguez-Creixéms M. et Bouza E.** 2005. An improved protocol for pulsed-field gel electrophoresis typing of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol.* 54: 155–157.
- Amatayakul T., Halmos A.L., Sherkat F. et Shah N.P.** 2006. Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *Int Dairy J.* 16: 40-51.
- Andrighetto C., Borney F., Barmaz A., Stefanon B. et Lombardi A.** 2002. Genetic diversity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian traditional cheeses. *Int Dairy J.* 12: 141-144.
- Axelsson L.** 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Von Wright A, eds. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Marcel Dekker Inc, New York: 1–72.
- Azadnia P., Khalegh Babaki A., Shah Ahmad Ghasemi M., Karimi Jashni M., Zamani M.H. et Taarof N.** 2011. Isolation and identification of Leuconostocs from traditional yoghurt in Tribes of Kazerun. *J anim Vet Ad.* 10 (4): 552-554.
- Badis A.** 2004. Identification et caractérisation technologique de bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de quatre populations caprines locales. Thèse de Doctorat. Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université d'Oran. 160 pp.
- Badis A., Guetarni D., Moussa Boudjema B., Henni D.E. et Kihal M.** 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiol.* 21(5): 579–588.
- Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R.** 2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabyle ». *Sciences et Technologi.* 23 : 30-37.
- Bahloul H.A., Hadadji M., Guessas B., Saidi N. et Kihal M.** 2012. Characterization and Technological Properties of *Bifidobacterium* Strains isolated from breast-fed infants. *Journal of Food Science and Engineering.* 2: 576-582.
- Barrett T.J., Lior H., Green J.H., Khakhria R., Wells J.G., Bell B.P., Greene K.D., Lewis J. et Griffin P.M.** 1994. Laboratory investigation of a multistate food-

- borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J Clin Microbiol.* 32: 3013–3017.
- Barrett T.J., Gener-Smidt et Swaminathan B.** 2006. Interpretation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathog Dis.*3 (1): 20-31.
- Behira B. et Kihal M.** 2011. Antibiotic resistance of some lactobacilli isolate from digestive broiler in western Algeria. *J Anim Vet Ad.*10(14): 1859-1862.
- Behringer M., Miller W. G. et Oyarzabal O.A.** 2011. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. *J Microbiol Methods.*84: 194–201.
- Belhadj H., Harzallah D., Khennouf S., Dahamna S., Bouharati S. et Baghiani A.** 2010. Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from Algerian honeybee collected pollen. *Acta Hort.* (ISHS) 854: 51 – 58.
- Ben Amor K., Vaughan E.E. et De Vos W.M.** 2007. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *J Nutr.* 741S–747S.
- Bendimerad N., Kihal M. et Berthier F.** 2012. Isolation, identification, and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation. *Dairy Sci Technol.*92(3): 249-264.
- Benmechernene Z., Fernandez-No I., Kihal M., Böhme K., Calo-Mata P. et Barros-Velazquez J.** 2013a. Recent patents on Bacteriocins: Food and Biomedical applications. *Recent Pat DNA Gene Se.*7: 66-73.
- Benmechernene Z., Chentouf H.F., Bellil Y., Ghazi F., Quintela-Baluja M., Calo-Mata P. et Barros-Velázquez J.** 2013b. Technological aptitude and applications of *Leuconostocmesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. *Biomed Res Int.* 2013. 14PP.
- Berthier F. et Ehrlich S.D.** 1999. Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 997-1007.
- Bielawski J.P., Noack K. et Pumo D.E.** 1995. Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA. *Bio-techniques.* 18: 856-860.
- Bilhère E., Lucas P. M., Claisse O. et Lonvaud-Funel A.** 2009. Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination. *Appl Environ Microbiol.* 75: 1291–1300.
- Black W.C., Duteau N.M., Puterka G.J., Nechols J.R., Pettorini J.M.** 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bull Entomol Res.*82: 151-159.

- Blaiotta G., Sorrentino, A., Ottombrino, A. et Aponte, M.** 2011. Technological and genotypic comparison between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* strains coming from the same dairy environment. *J Dairy Sci.* 94 (12): 5871-5877.
- Bolotin A., Quinquis B., Renault P., Sorokin A., Ehrlich S.D., Kulakauskas S., Lapidus A., Goltsman E., Mazur M., Pusch G.D., Fonstein M., Overbeek R., Kyprides N., Purnelle B., Prozzi D., Ngui K., Masuy D., Hancy F., Burtreau S., Boutry M., Delcour J., Goffeau A. et Hols P.** 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol.* 22(12): 1554-1558.
- Boumehira A.Z., Mami A., Hamedi A.R., Henni J.E., et Kihal M.** 2011. Identification and characterization of functional and technological *Lactobacillus plantarum* strains isolated from raw goat and camel milk collected in Algeria. *J Pure Appl Microbiol.* 5(2) : 553-566.
- Boutou R., Thuault D. et Bourgeois C.M.** 1995. Identification and characterization of *Streptococcus thermophilus* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Appl Bacteriol.* 79: 454-458.
- Brahmane M.P., Mitra K. et Mishra S.S.** 2008. RAPD fingerprinting of the ornamental fish Badis (Hamilton 1822) and Dario dario (Kullander and Britz, 2002) (Perciformes, Badidae) from West Bengal, India. *Genet Mol Biol.* 31: 789-792.
- Brehony C., Jolley K.A. et Maiden M.C.J.** 2007. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol Rev.* 31: 15–26.
- Brisabois A.,** 2001. Intérêt et limites des techniques de caractérisation des *Salmonella*. *Epidémiol et Santé Anim.* 39 : 31-42.
- Caetano-Anolles G., Bassam B.J. et Gresshoff P.M.** 1992. Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol Gen Genet.* 235: 157–165.
- Cai H., Rodriguez B.T., Zhang W., Broadbent J. R. et Steele J. L.** 2007. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbio.*153: 2655–2665.
- Carr F.J., Chill D. et Maida N.** 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit Rev Microbiol.*28(4): 281-370.
- Carriço J.A., Silva-Costa C., Melo-Cristino J., Pinto F.R., de Lencastre H., Almeida J.S. et Ramirez M.** 2006. Illustration of a Common Framework for Relating Multiple Typing Methods by Application to Macrolide-Resistant *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol.*44(7): 2524–2532.

- Cebeci Aydin A.** 2008. Molecular identification and typing of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. Thèse de Doctorat. METU University, Ankara, Turquie. 58-59.
- Chahrour W., Merzouk Y., Henni J.E., Haddaji M. et Kihal M.** 2013. Screening and identification of lactic acid bacteria isolated from sorghum silage processes in west Algeria. *Afr J Biotechnol.* 12(14): 1703-1709.
- Chaillou S., Daty M., Baraige F., Dudez A.M., Anglade P., Jones R., Alpert C.A., Champomier-Vergès M.C. et Zagorec M.** 2009. Intraspecies genomic diversity and natural population Structure of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei*. *Appl Environ Microbiol.* 75(4): 970-980.
- Chekroun A., Benbrinis S., Saidi D., Kihal M. et Kheroua O.** 2004. Estimation de l'antigénicité résiduelle des protéines du lactosérum de laits fermentés par des associations de bactéries lactiques et de Bifidobactéries. *J Alg Med.* 4 (XIII): 162-166.
- Chentouf H.F. et Benmcherrhene Z.,** 2013. Isolation and identification of *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk. *Afr J Microbiol Rev.* 7 (23): 2961-2969.
- Claisse O., Renouf V. et Lonveaud-Funel A.** 2007. Differentiation of wine lactic acid bacteria species based on RFLP analysis of a partial sequence of *rpoB* gene. *J Microbiol Meth.* 69: 387-390.
- Cocconcelli P.S., Porro D., Galandini S. et Senini L.** 1995. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Lett Appl Microbiol.* 21: 376-379.
- Coenye T., Spilker T., Martin A., and LiPuma J.J.** 2002. Comparative assessment of genotyping methods for Epidemiologic study of *Burkholderia cepacia* Genomovar III. *J Clin Microbiol.* 40(9): 3300–3307.
- Colmin C., Pbbay M., Simonet J.M. et Decaris B.** 1991. A species-specific DNA probe obtained from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* detects strain restriction polymorphism. *FEMS Microbiol Lett.* 81: 123-128.
- Corkill J.E., Graham R., Hart C.A. et Stubbs S.** 2000. Pulsed-field gel electrophoresis of degradation-sensitive DNAs from *Clostridium difficile* PCR ribotype 1 strains. *J Clin Microbiol.* 38: 2791–2792.
- Courtin P., Monnet, V. et Rul, F.** 2002. Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiolog.* 148: 3413-3421.
- Courtin P. et Rul F.** 2004. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait.* 84: 125-134.

- Cunningham M.W.** 2000. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *Clin Microbiol Rev.* 13(3), 470-511.
- Dalache F., Kacem M. et Karam N.E** 2003. Antibiorésistance de bactéries lactiques isolées de laits crus de vache, chèvre, brebis et chamelles d'Algérie. *Renc Rech Ruminants.* 10 : 231.
- Daoudi A.** 2006. La qualité d'un fromage local à base de lait de chèvre. Thèse de Magister en Biologie. Université Hassiba Ben-Bouali, Chlef. 148PP.
- Davin-Regli A., Abed Y., Charrel R.N., Bollet C. et de Micco P.** 1995. Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. *Res Microbiol.* 146: 561-568.
- Davis M.A., Hancock D. D., Besser T. E. et Call D. R.** 2003. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Microbiol.* 41(5): 1843-1849.
- De las Rivas B., Marcobal A. et Muñoz R.** 2004. Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol.* 70 : 7210–7219.
- De las Rivas B., Marcobal A. et Muñoz R.** 2006. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiology.* 152: 85–93.
- Delorme C., Poyart C., Ehrlich S.D. et Renault P.** 2007. Extent of horizontal gene transfer in evolution of Streptococci of the salivarius group. *J Bacteriol.* 189 (4): 1330-1341.
- Delorme C.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *Int J Food Microbiol.* 126: 274–277.
- De Roissart H. et Luquet F.M.** 1994. Bactéries lactiques. Uriage, Lorica, France. 605PP.
- Descheemaeker P., Lammens C., Pot B., Vandamme P. et Goossens H.** 1997. Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 555-561.
- Deveau H., Barrangou R., Garneau J.E., Labonte J., Fremaux C., Boyaval P., Romero D.A., Horvath P. et Moineau S.** 2008. Phage Response to CRISPR-Encoded Resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol.* 190(4): 1390-1400.

- De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. et Whitman W. B.** 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Volume 3: the *Firmicutes*, Springer, USA, 1422 PP.
- De Vuyst L. et Tsakalidou E.** 2008. *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *Int Dairy J.* 18: 476–485.
- Diancourt L., Passet V., Chervaux C., Garault P., Smokvina T. et Brisse S.**2007. Multilocus sequence typing of *Lactobacillus casei* reveals a clonal population structure with low levels of homologous recombination. *Appl Environ Microbiol.* 73: 6601–6611.
- Dimitrov Z., Michaylova M. et Mincova M.**2005. Characterization of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from Bulgarian yoghurt, cheese, plants and human faecal samples by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis of cell-wall proteins, ribotyping and pulsed field gel fingerprinting. *Int Dairy J.*15: 998–1005.
- Djadouni F. et Kihal M.** 2012. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Braz Arch Biol Technol.*55(3): 435-443.
- Djadouni F. et Kihal M.** 2013. Characterization and determination of the factors affecting anti-listerial bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from dairy milk products. *Afr J Food Sci.*7(2):35-44.
- Drici H., Gilbert C., Kihal M. et Atlan D.** 2010. Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. *J Appl Microbiol.* 108: 647–65.
- Du Plessis E.M. et Dicks L.M.T.** 1995. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amyglovorus*, *L. gallinarum*, *L. grasseri* and *L. johnsonii*. *Curr Microbiol.* 31: 114-118.
- Durlu-Özkaya F., Aslim B. et Taha Özkaya M.** 2007. Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *LWT -Food Science and Technology.* 40: 564-568.
- Dutra N.C., Telles M.P., Dutra D.L. et Silva Junior N.J.**2008. Genetic diversity in populations of the viper *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 in Central Brazil using RAPD markers. *Genet Mol Res.* 7: 603-613.
- Dykes G. A. et von Holy, A.** 1994. Strain typing in the genus *Lactobacillus*. *Lett Appl Microbiol.* 19: 63-66.

- Egly J.M., Mengus G., Monnet G. et Revelant O.** 1993. Eléctrophorèse en champs alternés de l'ADN. *Biofutur* n°127, cahier n°61.
- El-Abbassy M. Z. et Sitohy M.** 1993. Metabolic interaction between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in single and mixed starter yoghurts. *Nahrung*. 37: 53-58.
- Ercolini D., Fusco V., Blaiotta G. et Coppola S.** 2005. Sequence heterogeneity in the lacSZ operon of *Streptococcus thermophilus* and its use in PCR systems for strain differentiation. *Res Microbiol*. 156: 161–172.
- Escareño L., Salinas-Gonzalez H., Wurzinger M., Iñiguez L., Sölkner J. et Meza-Herrera C.** 2013. Dairy goat production systems. Status quo, perspectives and challenges. *Trop Anim Health Prod*. 45:17–34.
- Facklam R.** 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev*. 15: 613–630.
- FAO**database February 2012 Sources statistiques agricoles (<http://faostat.fao.org>)
- Farrow J.A. et Collins M.D.**, 1984. DNA base composition, DNA–DNA homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Gen Microbiol*130: 357–362.
- Feliachi K.** 2003. Point focal algérien pour les ressources génétiques. Rapport National sur les ressources génétiques animales. Algérie :29-30.
- Flint S.H., Ward L.J. et Brooks J.D.** 1999. *Streptococcus waius* sp. nov., a thermophilic *Streptococcus* from a biofilm. *Int J Syst Bacteriol*. 49: 759–767.
- Fox G. E., Wisotzkey J.D. et Jurtschuk Jr. P.** 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol*. 42:166-170.
- Fraga J., Rodriguez J., Fuentes O., Fernandez-Calienes A. et Castex M.** 2005. Optimization of random amplified polymorphic DNA techniques for use in genetic studies of Cuban Triatominae. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 47(5): 295-300.
- Gancheva A., Pot B., Vanhonacker K., Hoste B. et Kersters, K.**, 1999. A polyphasic approach towards the identification of *Lactobacillus acidophilus* strains belonging to and related species. *Syst Appl Microbiol*. 22(4): 573-585.
- Gevers D.** 2002. Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences. Université de Gent, Belgique.

- Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J., Stackebrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F.L., et Swings J.** 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews: Microbiology*.3: 733-739.
- Ghazi F.** 2003. Caractérisation microbiologique, biochimique, moléculaire et technologique de bactéries lactiques isolées de laits crus de la région de l'ouest Algérien. Thèse de Magister. Université d'Oran, Es-Senia. 146 PP.
- Ghazi F., Henni J.D., Benmecherne Z. et Kihal M.** 2009. Phenotypic and whole cell protein analysis by SDS-PAGE for identification of dominant lactic acid bacteria isolated from Algerian raw milk. *World J Dairy food Sci.* 4 (1): 78-87.
- Gil-Lamaignere C., Roilides E., Hacker J., et Müller F.M.C.** 2003. Molecular typing for fungi, a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin Microbiol Infect*.9: 172-185.
- Giraffa G., De Vecchi P., et Rossetti L.** 1998. Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. *J Appl Microbiol*.85: 918–924.
- Giraffa G., Paris A., Valcavi L., Gatti M. et Neviani E.** 2001. Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J Appl Microbiol.* 91: 937–943
- Giraffa G., Lazzi, C., Gatti M., Rossetti L., Mora D. et Neviani E.** 2003. Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. *Int J Food Microbiol.* 82: 163-172.
- Girard S.L. et Moineau S.** 2007. Analysis of two theta-replicating plasmids of *Streptococcus thermophilus*. *Plasmid*.58: 174–181.
- Goering R.V.** 2010. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol*.10: 866–875.
- Grattard F.** 2000. Electrophorèse en champ pulsé. Précis de bactériologie clinique. ESKA, Paris. 267-277.
- Grosberg R.K., Levitan D.R. et Cameron B.B.,** 1996. Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR Markers: A random primer for the nervous and novice. *Molecular zoology advances, strategies, and Protocols.* Wiley and Sons Publishers, New York.
- Guessas B. et Kihal M.** 2004. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *Afr J Biotechnol.* 3(6): 339-342.

- Guessas B.** 2007. Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran. 148PP.
- Guessa B., Adjoudj F., Hadadji M. et Kihal M.** 2012. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Dhan, a traditional butters their major technological traits. *World Appl Sc J.* 17(4): 480-488.
- Hadadji M. et Bensoltane A.,** 2006. Growth and lactic acid production by *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in goat's milk. *Afr J Biotechnol.* 5(6): 505-509.
- Hardie J.M. et Whiley** 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Appl Microbiol.* 83: 1S-11S.
- Harini S.S., Leelambika M., Shiva Karmeswari M.N. et Sathyanarayana N.,** 2008. Optimization of DNA isolation and PCR-RAPD methods for molecular analysis of *Urginea indica* (Kunth). *Int J Integr Biol.* 2: 138-144.
- Hassaïne O., Zadi-Karam H. et Karam N-E.** 2007. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). *Afr J Biotechnol.* 6(14): 1720-1727.
- Hassaïne O., Zadi-Karam H. et Karam N.E.** 2008. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from three breeds dromedary raw milks in south Algeria. *Emir J Food Agric.* 20 (1): 46-59.
- Heng S.K., Heng C.K. et Puthuchearry S.D.** 2009. Stacking gels: A method for maximizing output for Pulsed field gel electrophoresis. *Indian J Med Microbiol* 27(2): 142-5.
- Higashio K., Kikuchi T. et Furuichi E.** 1978. Symbiose entre *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* dans le yoghourt. paris. Xxe Congrès International, Lait, Paris, France. 522-523.
- Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossiord B., Prozzi D., Leblond-Bourget N., Decaris B., Bolotin A., Delorme C., Dusko Ehrlich S., Guedon E., Monnet V., Renault. Et Kleerebezem M.** 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* 29: 435–463.
- Holzappel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J. et Schillinger, U.,** 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.* 73(suppl): 365S–73S.
- Horvath P., Romero D.A., Coute-Monvoisin A.-C., Richards M., Deveau H., Moineau S. Boyaval P., Fremaux C. et Barrangou R** 2008. diversity,

- activity, and evolution of CRISPR Loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol.* 190(4): 1401-1412.
- Hubert L. et Arabie P.** 1985. Comparing partitions. *J Classification.* 2: 193–218.
- Hunter P.R et Gaston M.A.** 1988. Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J clin Microbiol.* 26(11): 2465-2466.
- Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et Karam N.E.** 2009. Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas Y Aceites.* 60 (2): 177-183
- Janssen P., Coopman R., Huys G., Swings J., Bleeker M., Vos P., Zabeau M. et Kersters K.** 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology.* 142: 1881–1893.
- Janzen T., Kleinschmidt J., Neve H., Geis A.** 1992. Sequencing and characterization of pST1, a cryptic plasmid from *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett.* 175-180.
- Jebava I., Plockova M., Lortal S. et Valence F.** 2011. The nine peptidoglycan hydrolases genes in *Lactobacillus helveticus* are ubiquitous and early transcribed. *IntJ Food Microbiol.* 148: 1–7.
- Jenkins J.K., Harper W.J. et Courtney P.D.** 2002. Genetic diversity in Swiss cheese starter cultures assessed by pulsed field gel electrophoresis and arbitrarily primed PCR. *Lett Appl Microbiol.* (35): 423–427.
- Johansson M. L., Quednau M., Molin G. et Ahrné S.** 1995. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett Appl Microbiol.* 21: 155-159
- Juillard V., Desmazeaud M. J. et Spinner, H. E.** 1988. Mise en évidence d'une activité uréasique chez *Streptococcus thermophilus*. *Can J Microbiol.* 34 : 818-822.
- Kacem M., Zadi-Karam H. et Karam N.E.** 2002. Bactéries lactiques isolées de laits de vaches, de brebis, et de chèvres de l'Ouest Algérien. *Renc Rech Ruminants.* 9: 375.
- Kacem M., Zadi-Karam H. et Karam N.E.** 2004. Isolation of lactic acid bacteria for its possible use in the fermentation of green Algerian olives. *Grasas y Aceite.* 55(4): 385-393.
- Kadi S. A., Hassini F., Lounas N. et Mouhous A.** 2013. Caractérisation de l'élevage caprin dans la région montagnaise de Kabylie en Algérie. Rapport du Département

desSciences Agronomiques, Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques, Université M. Mammeri, Tizi Ouzou. 5 pp.

- Kam K.M., Luey C.K., Tsang Y.M., Law C.P., Chu M.Y., Cheung T.L. et Chiu A.W.** 2003. Molecular subtyping of *Vibrio cholerae* O1 and O139 by pulsed-field gelelectrophoresis in Hong Kong: correlation with epidemiological events from 1994 to 2002. *J Clin Microbiol.* 41: 4502–4511.
- Kawamura Y., Hou X.G., Sultana F., Miura H. et Ezaki T.** 1995. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol.* 45: 406–408.
- Khaled Daud A.K., Neilan B.A., Henriksson A. et Conway P.L.** 1997. Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 53: 191–197.
- Kidd T.J., Grimwood K., Ramsay K.A., Rainey P.B. et Bell S.C.,** 2011. Comparison of Three Molecular Techniques for Typing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in sputum samples from Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol.* 49 (1): 263–268.
- Kihal M., Prévost H., Lhotte M.E., Huang D.Q. et Diviès C.** 1996. Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *Lett Appl Microbiol.* 22: 219–223.
- Kihal M., Henni J.E., Prevost H. et Diviès C.** 2006. A new manometric method for measuring carbon dioxide production by dairy starter culture: a case of *Leuconostoc mesenteroides*. *Afr J Biotechnol.* 5(4): 378–383.
- Kihal M., Prevost H., Henni J.E., Benmcherrhene Z. et Diviès C.** 2007. Carbon dioxide production by *Leuconostoc mesenteroides* grown in single and mixed culture with *Lactococcus lactis* in skimmed milk. *J Dairy food Sci.* 2(2): 62–68.
- Klaenhammer T.R., Barrangou R., Buck B.R., Azcarate-Peril M.A. et Altermann E.** 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev.* 29: 393–409
- Klein G., Pack A., Bonaparte C. et Reuter G.** 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 41: 103–125.
- Koiche M. et Dilmi B.** 2010. Selection of local extremophile lactic acid bacteria with high capacity to degrade lactose: Potential use to reduce intolerance to lactose in vitro. *Afr J Biotechnol.* 9 (11): 1635–1640.
- Kumar N.S. et Gurusubramanian G.** 2011. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Sci Vis.* 11 (3): 116–124.

- Lacerda D.R., Acedo M.D.P., Filho J.P.L. et Lovato M.B.** 2002. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Lundiana*. 3: 87-92.
- Langa S., Fernandez A., Martin R., Reviriego C., Marin M.L., Fernandez L. et Rodriguez J.M.** 2003. Differentiation of *Enterococcus faecium* from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains by PCR and dot-blot hybridisation. *Int J Food Microbiol*. 88: 197–200.
- Laref N., Guessas B. et Kihal M.** 2013. Antifungal compounds production in different temperatures, pH and on modified MRS Agar by *Lactobacillus* strains. *J Biol Sci*. 13(2): 94-99.
- Lazzi C., Bove C.G., Sgarbi E., Gatti M., La Gioia F., Torriani S., Neviani E.** 2009. Application of AFLP fingerprint analysis for studying the biodiversity of *Streptococcus thermophilus*. *J Microbiol Meth*. 79: 48–54.
- Lefébure, T. et Stanhope M.J.,** 2007. Evolution of the core and pan-genome of *Streptococcus*: positive selection, recombination, and genome composition. *Genome Biol* 8(5): R71-R71.
- Leksir C.** 2012. Caractérisation et contrôle de la qualité de ferments lactiques utilisés dans l'industrie laitière algérienne. Thèse de Magister. Université Mentouri de Constantine. 110PP.
- Magalhães M., Martinez R.A. et Gaiotto F.A.** 2007. Genetic diversity of *Litopenaeus vannamei* cultivated in Bahia State, Brazil. *Pesq Agropec Bras*. 42: 1131-1136.
- Maiden M.C.J., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G. Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M. et Spratt B.G.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *PNAS USA*. 95: 3140-3145.
- Maiden M.C.J.** 2006. Multi locus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 60: 561-580. 103(42), 15611-15616.
- Mainville I., Robert N., Lee B. et Farnworth E.R.** 2005. polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. *Syst Appl Microbiol*. 29: 59-68.
- Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V., Polouchine N., Shakhova V., Grigoriev I., Lou Y., Rohksar D., Lucas S., Huang K., Goodstein D.M., Hawkins T., Plengvidhya V., Welker D., Hughes J., Goh Y., Benson A., Baldwin K., Lee J.-H., Díaz-Muñiz I., Dosti B., Smeianov V., Wechter W., Barabote R., Lorca G., Altermann E., Barrangou R., Ganesan B., Xie Y., Rawsthorne H., Tamir D., Parker C., Breidt F., Broadbent J., Hutkins R.,**

- O'Sullivan D., Steele J., Unlu G., Saier M., Klaenhammer T., Richardson P., Kozyavkin S., Weimer B. et Mills D.** 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.*
- Mami A., Boumehira A.Z., Hamedi A. R., Henni J.E. et Kihal M.** 2012. Screening of autochthonous *Lactobacillus* species from Algerian raw goats' milk for the production of bacteriocin-like compounds against *Staphylococcus aureus*. *Afr J Microbiol Res.* 6(12): 2888-2898.
- Marino M., Maifreni M., et Rondinini G.** 2003. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 229: 133–140
- Marroki A., Zúñiga M., Kihal M. et Pérez-Martínez G.** 2011. Characterisation of *Lactobacillus* from Algerian Goat's milk based on phenotypic, 16S rDNA sequencing and their technological proprieties. *Braz J Microbiol.* 42: 158-171.
- Mayer H.K., Bonaparte C., Domig K.J. et Kneifel W.** 1998. Charakterisierung von probiotischen Milchsäurebakterienmittels molecular biologischer Verfahren. Österreichische Lebensmittelchemikertage. *Biochemische Nachweismethoden.* 157-168
- McCartney A. L.,** 2002. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British J Nutr* 88(Suppl. 1): S29–S37.
- McGregor D.A. et Yeung S.E.** 1992. Interactive Control of pulsed field gel electrophoresis via real time monitoring. *Anal Chem.* 64: 1-6.
- Merzouk Y., Chahrour W., Zarour K., Zergui A., Saidi N., Henni J.E. et Kihal M.** 2013. Physico-chemical and Microbiological Analysis of Algerian Raw Camel's Milk and identification of predominating thermophilic lactic acid bacteria. *Journal of Food Science and Engineering.* 3: 55-63.
- Michaylova M., Minkova S., Kimura K., Sasaki T. et Isawa K.** 2007. Isolation and characterization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria. *FEMS Microbiol Lett.* 269: 160–169.
- Mietton B., Desmazeaud M., de Roissard H. et Weber F.** 1994. Transformation du Lait en fromage ; in « Bactéries lactiques II ». de Roissard et Luquet, Tech. Doc., Lavoisier, Paris
- Mohania D., Nagpal R., Kumar M., Bhardwaj A., Yadav M., Jain S., Marotta F., Singh V., Parkash O. et Yadav H.** 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *J Dig Dis.* 9: 190-198.

- Monnet C., Mora D. et Corrieu G.** 2005. Glutamine synthesis is essential for growth of *Streptococcus thermophilus* in milk and is linked to urea catabolism. *Appl Environ Microbiol* 71 (6): 3376-3378.
- Mora D., Fortina M.G, Parini C., Ricci G., Gatti M., Giraffa G. et Manachini P.L.** 2002. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J appl Microbiol.* 93:278-287.
- Morandi S. et Brasca M.** 2012. Safety aspects, genetic diversity and technological characterisation of wild-type *Streptococcus thermophilus* strains isolated from north Italian traditional cheeses. *Food Control.* 23 (1): 203-209.
- Moschetti G., Blaiotta G., Aponte M., Catzeddu P., Villani F., Deiana, P. et Coppola S.**1998. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *J Appl Microbiol.* 85: 25-36.
- Moschetti G., Blaiotta G., Villani F., Coppola S. et Parente E.** 2001. Comparison of statistical methods for identification of *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium* from randomly amplified polymorphic DNA patterns. *Appl Env Microbiol.* 67: 2156-2166.
- Moulay M., Aggad H., Benmcherenene Z., Guessas B., Henni D.E. et Kihal M.** 2006. Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. *World J Dairy food Sci.*1: 12-18.
- Moulay M., Benlahcen K., Aggad H. et Kihal M.** 2013. Diversity And Technological Properties of Predominant lactic acid bacteria isolated from algerian raw goat's milk. *Adv Environ Biol.* 6: 999-1007.
- Moussa Boudjemaa B., Tarnadijo E., Bensoltane A., Fresno J.M. et Kihal M.** 2004. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas sobre *Listeria monocytogenes*. *Alimentaria.* 355 : 11-16.
- Moustaria A.** 2008. Identification des races caprines des zones arides en Algérie. *Revue des régions arides.* 21 : 1378-1382.
- Myers L.E., Silva S.V.P.S., Procunier J.D. et Little P.B.** 1993. Genomic Fingerprinting of "*Haemophilus somnus*" Isolates by Using a Random-Amplified Polymorphic DNA Assay. *J Clin Microbiol.* 31 (3): 512-517.
- Nedjraoui D.** 2003. Algérie, Profil fourrager. Document FAO (2003). 30 PP.
- Nigatu A., Ahrné S., Gashe B.A. et Molin G.** 1998. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for discrimination of *Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici* and rapid grouping of *Pediococcus* isolates. *Lett Appl Microbiol.* 26: 412-416.

- Nigatu A., Ahrne S. et Molin G.** 2001. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles for the distinction of *Lactobacillus* species. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 79: 1-6.
- N.N.** 2006. Joint FAO/ WHO working group report on drafting guidelines for evaluation of probiotics in food. FAO Food and nutrition paper 85.
- Oguntoyinbo F.A. et Narbad A.** 2012. Molecular characterization of lactic acid bacteria and in situ amylase expression during traditional fermentation of cereal. *Food Microbiol.* 31: 254- 262.
- Okatani A.T., Uto T., Taniguchi T., Horisaka T., Horikita T., Kaneko K.I. et Hayashidani H.** 2001. Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Differentiation of *Erysipelothrix* Species Strains. *J Clin Microbiol.* 39 (11): 4032–4036.
- Orla-Jensen S.**1919. The lactic acid bacteria. Copenhagen: *Anhr Fred Host and Son.*
- O’Sullivan T.F. et Fitzgerald G.F.** 1998. Comparaison of *Streptococcus thermophilus* strains by pulsed field gel electrophoresis of genomic DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 168: 213-219.
- O’Sullivan L., Ross R.P. et Hill C.** 2002. Potential of bacteriocin producing lactic acid bacteria for improvement in food safety and quality. *Biochimie.* 84: 593-604.
- Ott A., Germond J. E. et Chaintreau A.** 2000. Origin of acetaldehyde during milk fermentation using (13) C-labeled precursors. *J Agric Food Chem.*48: 1512–1517.
- Padmalatha K. et Prasad M.N.V.** 2006. Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *Afr J Biotechnol.* 5: 230-234.
- Pan Y.B., Burner D.M., Ehrlich K.C., Grisham M.P. et Wei Q.** 1997. Analysis of Primer-Derived, nonspecific amplification products in RAPD-PCR. *Biotechniques.* 22(6): 1071-1077.
- Park Y.W.** 2012. Goat milk and human nutrition. Proceedings of the 1st Asia Dairy Goat Conference, Kuala Lumpur, Malaysia, 9–12 April 2012.
- Patrignani, F. Lanciotti R., Mathara J. M., Guerzoni M. E. et Holzapfel W. H.** 2006. Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. *Int J Food Microbiol.* 107: 1 – 11.
- Payne R.P., Lee M.D., Dreesen D.W. et Barnhart H.M.** 1999. Molecular Epidemiology of *Campylobacter jejuni* in broiler flocks using uandomly amplified polymorphic DNA-PCR. and 23S rRNA-PCR and role of litter in its Transmission. *Appl Env Microbiol.* 65 (1): 260–263.

- Penner G.A., Bush A., Wise R., Kim W., Domier L., Kasha K., Laroche A., Scoles G., Molnar S.J. et Fedak G.** 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Appl.* 2(4): 341–345.
- Picozzi C., Bonacina G., Vigentini I et Foschino R.** 2010. Genetic diversity in Italian *Lactobacillus sanfranciscensis* strains assessed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis analyses. *Microbiology.* 156: 2035–2045.
- Plengvidhya V., Breidt F. et Fleming H.P.** 2004. Use of RAPD-PCR as a method to follow the progress of starter cultures in sauerkraut fermentation. *Int J Food Microbiol.* 93: 287– 296.
- Power E.G.** 1996. RAPD typing in microbiology: a technical review. *J Hosp Infect.* 34: 247-265.
- Poyart C., Quesne G., Coulon S., Berche P. et Trieu-Cuot P.** 1998. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol.* 36: 41–47.
- Raghunathachari P., Khanna V.K., Singh U.S. et Singh N.K.** 2000. RAPD analysis of genetic variability in Indian scented rice germplasm (*Oryza sativa* L.). *Curr Sci.* 79(7): 994-998.
- Ramos J.R., Telles M.P.C., Diniz-Filho J.A.F., Soares T.N., Melo D.B. et Oliveira G.** 2008. Optimizing reproducibility evaluation for random amplified polymorphic DNA markers. *Genet Mol Res.* 7(4): 1384-1391.
- Rao D.R. et Reddy A.V.** 1984. Biosynthesis and utilization of folic acid and vitamine B12 by lactic acid cultures in skim milk. *J Dairy Sci.* 67: 1169-1174.
- Rasmussen T.B., Danielsen M., Valina O., Garrigues C., Johansen E. et Pedersen M.B.** 2008. *Streptococcus thermophilus* Core Genome: Comparative Genome Hybridization Study of 47 Strains. *Appl Environ Microbiol.* 74(15): 4703-4710.
- Rementeria A., Gallego L., Quindos G. et Garaizar J.** 2001. Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. *Clin Microbiol Infect.* 7: 331–336.
- Rizzotti L., La Gioia F. et Dellaglio F.** 2009. Characterization of Tetracycline-Resistant *Streptococcus thermophilus* isolates from Italian soft cheeses. *Appl Environ Microbiol.* 75(12): 4224-4229.
- Rodas A.M., Ferrer S. et Pardo I.** 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine system. *J Appl Microbiol.* 26: 412–422.

- Rodas A.M. , Ferrer S. et Pardo I.** 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int J Syst Evol Microbiol.*55: 197-207.
- Romling U. et Tummler B.**2000. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 38: 464–465.
- Rossello-Mora R. et Amann R.,** 2001. The Species Concept for Prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.*25: 39-67.
- Rossetti L. et Giraffa G.** 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J Microbiol Methods.*63: 135– 144.
- Roussel Y., Colmin C., Simonet J.M. et Decaris B.** 1993. Strain characterization, genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group (Hansen and Møgelvang). *J Appl Bacteriol.* 74: 549-556.
- Rudolph K.M., Parkinson A.J. et Roberts M. C.** 1998. Molecular Analysis by pulsed-field gel electrophoresis and antibiogram of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 6B Isolates from Selected Areas within the United States. *J Clin Microbiol.* 36 (9): 2703-2707.
- Ruiz P., Izquierdo P.M., Sesena S. et Palop M.L.** 2008. Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiol.*25: 942–948.
- Sacilik S.C., Osmanagaolo O., Gunduz U. et Cokmus C.** 2000. Availability of use of total extracellular proteins in SDS-PAGE for characterisation of Gram positive cocci. *Turk J Biol.* 24: 817-823.
- Saeedi B., Hallgren A., Jonasson J. , Nilsson L., Hanberger H. et Isaksson B.** 2002. Modified pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of Enterococci. *APMIS.* 110: 869–74.
- Saidi D. Kihal M., Hamama A., Chekroune A., Henni D.E et Kheroua O.** 2005. Characterisation of Algerian raw camel's milk identification of dominant lactic acid bacteria and protein analysis. *Journal Algérien des Régions Arides.*4:01-09.
- Saidi N.** 2007. La microflore lactique du lait cru de chèvre local : Etude, microbiologique, biochimique et génétique des bactéries lactiques d'intérêt bio-préservateur Thèse de Doctorat. Université d'Oran, Es-Senia. 216pp.
- Saidi N., Hadadji M. et Guessas B.** 2011. Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from west Algerian goat's milk. *Global J of Biotechnol & Biochem.* 6 (3): 154-161.

- Salzano G., Moschetti G., Villani F. et Coppola S.** 1993. Biotyping of *Streptococcus thermophilus* strains by DNA fingerprinting. *Res Microbiol.* 144: 381-387.
- Samelis J., Tsakalidou E., Metaxopoulos J. et Kalantzopoulos G.** 1995. Differentiation of *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus curvatus* isolated from naturally fermented Greek dry salami by SDS-PAGE of Whole cell proteins. *J Appl Bacteriol.* 78: 157-163.
- Samore M., Killgore G., Johnson S., Goodman R., Shim J., Venkataraman L., Sambol S., De Girolami P., Tenover F., Arbeit R. et Gerding D.** 1997. Multicenter typing comparison of sporadic and outbreak *Clostridium difficile* isolates from geographically diverse hospitals. *J Infect Dis.* 176: 1233-1238.
- Sanchez I., Sesena S. et Palop L.** 2003. Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplant by SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. *Int J Food Microbiol.* 25(55): 181-189.
- Sanchez I., Sesena S. et Palop L.L.** 2004. Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with 'Almagro' eggplants spontaneous fermentation, based on combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis patterns. *J Appl Microbiol.* 97: 446-458.
- Santos R.P., Angelo P.C.S., Quisen R.C., Oliveira C.L. et Sampaio P.T.B.** 2007. RAPD em Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke): adaptação do método para coleta de amostras in situ, ajuste das condições de PCR e apresentação de um processo para selecionar bandas reprodutíveis. *Acta Amazonica.* 37: 253-260.
- Saunders G.C., Dukes J. et Parkes H.C., Cornett J.H.** 2001. Interlaboratory Study on Thermal Cycler Performance in Controlled PCR and Random Amplified Polymorphic DNA Analyses. *Clin Chem.* 47(1): 47-55.
- Schleifer K.H., Ehrmann M., Krusch U. et Neve H.** 1991. Revival of the species *Streptococcus thermophilus*, ex Orla-Jensen, 1919. nom. *Rev Syst Appl Microbiol.* 14: 386-388.
- Schwartz D.C. et Cantor C. R.** 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37: 67-75.
- Senini L., Ricci G., Manachini P.L., Mora D., Stiles M.E. et Holzapfel W.H.** 2004. EPS phenotype and genotype in *Streptococcus thermophilus* strains of dairy origin. *Ann Microbiol.* 54 (1): 59-71.
- Sermet-Gaudelus I., Le Bourgeois M., Pierre-Audigier C., Offredo C., Guillemot D., Halley S., Akoua-Koffi C., Vincent V., Sivadon-Tardy V., Ferroni A.,**

- Berche P., Scheinmann P., Lenoir G. et Gaillard J.L.** 2003. *Mycobacterium abscessus* and Children with Cystic Fibrosis. *Emerg Infect Dis.*9 (12): 1587-1591.
- Silbert S., Boykenb L., Hollis R.J. et Pfaller M.A.** 2003. Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. *Diag Microbiol Infect Dis.*47: 619–62.
- Simpson P. J., Stanton C., Fitzgerald G. F. et Ross R. P.** 2002. Genomic Diversity within the Genus *Pediococcus* as Revealed by randomly amplified polymorphic DNA PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 68(2): 765–771.
- Singh S., Goswami P., Singh R. et Heller K.J.** 2009. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *Food Sci Technol.*42 :448–457.
- Singh B., Yadav R., Singh H., Singh G. et Punia A.** 2010. Studies on Effect of PCR-RAPD Conditions for molecular analysis in Asparagus (Satawari) and Aloe Vera” Medicinal Plants. *AustJBasic&ApplSci.*4(12): 6570-6574.
- Siragusa S., Di Cagno R., Ercolini D., Minervini F., Gobbetti M. et De Angelis M.** 2009. Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during Wheat Flour Sourdough Type I Propagation Using *Lactobacillus* *sanfranciscensis* Starters. *Appl Environ Microbiol.*1099–1109.
- Skorić M., Šiler B., Banjanak T., Živković .J, Dmitrović S., Mišić D. et Grubišić D.** 2012. The reproducibility of RAPD profiles: effects of PCR components on RAPD analysis of four *Centaureum* species. *Arch Biol Sci Belgrade.* 64 (1): 191-199.
- Soares T.N., Chaves L.J., de Campos Telles M.P., Diniz-Filho J.A. et Resende L.V.**2008. Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* (“baru” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. *Genetica.* 132: 9-19.
- Somers E.B., Johnson M.E. et Wong A.C.L.** 2001. Biofilm Formation and Contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *J Dairy Sci.*84: 1926–1936.
- Spinnler, H. E., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J. et Corrieu, G.** 1987. Measurement of the partial pressure of dissolved CO₂ for estimating the concentration of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus bulgaricus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 25: 464-470.
- Stiles M. E. et Holzapfel W.H.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.* 36 (1): 1-29.
- Struelens M. J.** 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect.*2: 2–11.

- Tabak S. et Bensoltane A.** 2012. L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature & Technologie*. 6 : 71-79.
- Tamine A.Y. et Deeth H.C.** 1980. Yogurt: technology and biochemistry. *J Food Protection*. 43: 939-977.
- Tamine A.Y. et Robinson R. K.**, 1999. *Yoghurt, Science and technology*. Woodhead publishing limited: Cambridge.
- Tanganurat W., Quinquis B., Leelawatcharamas V. et Bolotin A.** 2009. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Thai fermented fruits and vegetables. *J Basic Microbiol*. 49: 377–385.
- Telles M.P.C. et Soares T.N.** 2007. DNA Fingerprinting no Estudo de Populações de Plantas do Cerrado. In: Recursos Genéticos e Conservação de Plantas Medicinais do Cerrado (Pereira AMS, ed.). Editora Legis Summa; FAPESP, Ribeirão Preto: 109-145.
- Temmerman R., Huys G. et Swings J.** 2004. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. *Trends Food Sci Tech*. 15: 348–359
- Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B. E., Persing D.H. et Swaminathan B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 33(9): 2233-2239.
- Thangaraj M., Prem V., Ramesh T. et Lipton A.P.** 2011. RAPD fingerprinting and demonstration of genetic variation in three pathogens isolated from Mangrove environment. *Asian J Biotechnol*. 3(3): 269-274.
- Tosi L., Berruti G., Danielsen M., Wind A., Huys G. et Morelli L.** 2007. Susceptibility of *Streptococcus thermophilus* to antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 92:21–28.
- Trujillo S., Keys C.E. et Brown C. E.**, 2011. Evaluation of the taxonomic utility of six-enzyme pulsed-field gel electrophoresis in reconstructing *Salmonella* subspecies phylogeny. *Infect Genet Evol*. 11: 92–102.
- Tyler K.D., Wang G., Tyler S.D. et Johnson W.M.** 1997. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol*. 35 (2): 339–346.
- Van Belkum A., Kluytmans J., van Leeuwen, Bax R., Quint W., Peters E., Fluit A., Vandenbroucke-Grauls C., van den Brule A. et Koeleman H.** 1995. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 33: 1537-1547.

- Van Belkum A., Struelens M., de Visser A., Verbrugh H. et Tibayrenc M.** 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 14: 547-60.
- Van Belkum A., Tassios P.T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N.K., Fussing V., Green J., Feil E., Gerner-Smidt P., Brisse S. et Struelens M.** 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 13 (Suppl. 3): 1–46.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. et Swings J.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* 60(2): 407-438.
- Ventura M. et Zink R.** 2002. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Lett.* 217: 141–154.
- Venturi M., Guerrini S., Granchi L. et Vincenzini M.** 2012. Typing of *Lactobacillus sanfranciscensis* isolates from traditional sourdoughs by combining conventional and multiplex RAPD–PCR profiles. *Int J Food Microbiol.* 156: 122-126.
- Vos P.,** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-14.
- Wallace D. L.** 1983. A method for comparing two hierarchical clusterings: Comment. *J Am Stat Asso.* 78: 569–576.
- Welsh J. et McClelland M.** 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-8.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K. J., Rafalski J.A. et Tingey S.V.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wolff K., Schoen E.D. et Peters-Van Rijn J.** 1993. Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum. *Theor Appl Genet.* 86: 1033-1037.
- Yost C.K. et Nattress F.M.** 2002. Molecular typing techniques to characterize the development of a lactic acid bacteria community on vacuum-packaged beef. *Int J Food Microbiol.* 72: 97–105.
- Zadi Karam H. et Karam N.E.** 2006. Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souches de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropicicultura.* 24(3) : 153-156.

Zhang Y., Yakrus M.A., Graviss E.A., Williams-Bouyer N., Turenne C., Kabani A. et Wallace R.J. 2004. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Study of Mycobacterium abscessus Isolates previously affected by DNA degradation. *J Clin Microbiol.* 42(12): 5582–5587.

ANNEXE

50 mM EDTA (pH 8.5):

9.305 g de disodium ethylènediamine tétracétate, 2 H₂O ont été ajoutés à 400 ml d'eau distillée. Le pH a été ensuite ajusté à 8.5 avec du NaOH (avec les pastilles de NaOH) et le volume final a été complété à 500 ml avec de l'eau distillée.

Autoclavage 121°C pendant 15 min

0.5 M EDTA (pH 8):

93.05 g de disodium ethylènediamine tétracétate, 2H₂O ont été ajoutés à 400 ml d'eau distillée. Le pH a été ajusté à 8 avec du NaOH et le volume final a été complété à 500 ml avec de l'eau distillée. Autoclavage à 121°C pendant 15 min.

TBE 5 X (pH 8):

54 g de Tris base (Tris hydroxyméthyl aminométhane) et 27.5 g d'acide borique ont été dissouts dans à peu près 900 ml d'eau distillée. Puis, 20 ml de 0.5 M d'EDTA (pH 8) ont été ajouté et le volume final de la solution ajusté à 1L avec de l'eau distillée. Autoclavage à 121°C pendant 15min. la solution TBE 5X a été conservée à température ambiante.

Tampon 0.5 X TBE (pH 8): A 100 ml de TBE 5X (pH 8) ont été ajouté de l'eau distillée jusqu'à atteindre 1000 ml.

Solution I: (50 mM EDTA, 0.05% (p/v) de N-lauryl sarcosine, 2 mg/ml de lysozyme) contient:

0.05 de of N-lauryl sarcosine

100 ml d'EDTA (50 mM, pH 8.5)

Autoclave à 121°C pendant 15min

2 mg/ml de lysozyme sont ajoutés juste avant utilisation.

Solution II: 1% (p/v) SDS, 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.5) contient:

10 ml de SDS à 10 % (1g dans 10 ml d'eau distillée)

1 ml Tris-HCl (1M, pH 8.5)

89 ml EDTA (50 mM pH 8.5)

La solution SDS n'est pas stérilisée.

Tris-HCl (1M, pH 8.5) :

12.11g Tris base (hydroxyméthyl-aminométhane) ont été dissouts dans 80 ml d'eau distillée et le pH ajusté à 8.5 avec du HCl. la solution a été complétée à 100 ml avec de l'eau distillée et autoclavée à 121°C pendant 15min.

Tampon de lyse des Bactéries à Gram positive: (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100) le lysozyme (20 mg/ml) est ajouté directement avant utilisation.

2 ml Tris-HCl 1M, pH 8

0.4 ml EDTA 0.5 M, pH 8

1.2% Triton X 100

ARTICLES RELATIVES À LA THÈSE

Full Length Research Paper

The reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles of *Streptococcus thermophilus* strains with XD9, M13 and OPI-02 MOD primers

Fatima Ghazi^{1*}, Zineb Benmechernene¹, Mebrouk Kihal¹ and G. Candan Gurakan²

¹Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, Oran University, Es-Senia 31100, Oran, Algeria.

²Department of Food Engineering, Middle East Technical University, Ankara, Turkey.

Accepted 16 September, 2013

We optimized the conditions for generating random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles of *Streptococcus thermophilus* strains by using the polymerase chain reaction (PCR). Several factors can cause the amplification of false and non reproducible bands in the RAPD profiles. We tested three primers, OPI-02 MOD, M13 and XD9 throughout this study. In addition, we tested different concentrations of primer, DNA template and Taq DNA polymerase. We adjusted the ratio of the primer to DNA template. All the three primers yielded reproducible profiles on several days, under optimized concentrations of components and cycling parameters used. The bands of such profiles probably corresponded to perfect annealing sites amplified with good efficacy or present in multiple copies in the genome. Five months later, repeated experiment generated identical bands. However, extra faint bands were detected with M13 and XD9 primers, possibly, corresponding to nonspecific binding resulting from slight variation in temperature or calibration of the thermocycler. Therefore, OPI-02 MOD was determined as the most reliable primer for reproducible profiles of *S. thermophilus* strains.

Key words: *Streptococcus thermophilus*, random amplified polymorphic DNA (RAPD), DNA template, Taq DNA polymerase, OPI-02MOD, XD9, M13, optimization, reproducibility.

INTRODUCTION

Streptococcus thermophilus is considered to be the second most important species of industrial lactic acid bacteria, after *Lactococcus lactis*, with a market value of about 40 billion US\$; over 10^{21} live cells are ingested annually by the human population. It is well known as a starter culture component in yoghurt fermentation and cheese making (De Vuyst and Tsakalidou, 2008; Hols et al., 2005). Despite the fact that no natural habitat for this species outside the dairy environment has been identified, considerable inter-strain diversity has been observed (O'Sullivan and Fitzgerald, 1998).

Random amplified polymorphic DNA technique (RAPD)

constitutes a useful technique for the study of genetic polymorphism of DNA. It involves the amplification of random segments of genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR), using short single primers of arbitrary sequence (Williams et al., 1990).

This molecular approach has been widely utilized to identify and study the level of biodiversity among *S. thermophilus* strains (Morandi and Brasca, 2012; Lazzi et al., 2009; Rizzotti et al., 2009; Andrighetto et al., 2002; Mora et al., 2002; Giraffa et al., 2001; Moschetti et al., 1998). It is a very sensitive and simple technique and is suggested as a fast tool for characterization of a large

*Corresponding author. E-mail: ghazifati@yahoo.fr. Tel: 00213777911244. Fax: 0021341342576.

number of lactic acid bacteria isolated from dairy products (Lazzi et al., 2009; Ramos et al., 2008); but, this method is prone to poor reproducibility in the band pattern, due to even small changes in reaction conditions; for this reason, it should be highly standardized to achieve satisfactory reproducibility (Skorić et al., 2012; Singh et al., 2009).

The PCR conditions for RAPD analysis can be optimized by varying the concentrations of the reaction mixture components and other reaction factors such as primer annealing, primer extension, denaturation time (Skorić et al., 2012; Singh et al., 2010; Fraga et al., 2005; Tyler et al., 1997; Wolff et al., 1993). The aim of this study was to optimize the concentrations of Taq DNA polymerase, DNA template and primer of PCR reactions and to study their effect on RAPD profiles and reproducibility. The RAPD-PCR of *S. thermophilus* genomic DNA was performed with XD9, M13 and OPI-02 MOD primers. It is useful to develop a reliable RAPD-PCR fingerprinting method for further study of *S. thermophilus* genetic diversity at strain level and to be able to distinguish between a large number of new isolates of *S. thermophilus* quickly and efficiently.

MATERIALS AND METHODS

Streptococcus thermophilus strains

Twenty one (21) *S. thermophilus* strains (S1-3, K1-15, N4-3, K1-31, N8-2, S1-3, K1-15, K1-7, N5-4, K1-1, S1-3, N2-1, K1-15, N8-2, N6-1, K1-22, N6-2, S1-1, K1-26, K1-12, N3-1) isolated from Turkish traditional yoghurts, were used in this study (from the collection of Food Analysis Laboratory, Middle East Technical University, Ankara, Turkey). The reference strain *S. thermophilus* LMG18311 and the *S. thermophilus* strain Yo-mix 410-3 (from Danisco Commercial starter culture) were also included. They were grown at 42°C in M17 broth, pH 6.8 and stored at -80°C in M17 glycerol.

DNA isolation

The DNA of *S. thermophilus* strains was extracted by The GeneJET™ Genomic DNA Purification kit (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration and the ratio A260/A280, for checking the purity of DNA, were calculated using UV Spectrophotometer (NanoDrop). All the DNA solutions obtained were stored at -20°C.

Optimization of RAPD reaction

The following three primers, obtained from Metabion International (Deutschland) were used, separately, for amplification: XD9 primer: 5'-GAAGTCGTC-3' (Moschetti et al., 1998); OPI-02 MOD primer: 5'-GCTCGGAGGAGAGG-3' (Mora et al., 2002) and M13 primer: 5'-GAGGGTGCGGTTCT-3' (Huey and Hall, 1989).

PCR amplification was carried out in MJ mini personal Thermal cycler (Bio-Rad). The cycling programs used were those described by Moschetti et al. (1998), for XD9 primer and Mora et al. (2002) for OPI-02 MOD primer. The cycling program with M13 primer consisted of an initial denaturation step at 94°C for 2 min and then 40 cycles of 94°C for 1 min; 42°C for 20 s and 72°C for 2 min. The

final elongation was performed at 72°C for 10 min. Amplification was performed in a final volume of 50 µl RAPD-PCR reaction mixture containing 1X PCR buffer. The optimization of RAPD-PCR reaction conditions was performed by varying concentrations as follows: 40, 60, 80, 100, 150 ng of DNA template, 0.5, 1, 1.25, 1.3, 1.5, 2, 2.5, 3.5 U of Taq DNA polymerase (Fermentas) and 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1 µM of primer.

The concentrations of MgCl₂ (3.5 mmol l⁻¹ for XD9 primer, 2.5 mmol l⁻¹ for OPI-02 MOD primer and 3 mmol l⁻¹ for M13 primer) and dNTPs (200 µmol l⁻¹ of each dATP, dCTP, dGTP and dTTP) were maintained constant with values as given by Fermentas Manufacturer and the authors above. Reactions without DNA were used as negative controls, which were prepared for each set of reaction mixture and included in all gels.

RAPD products were resolved by electrophoresis at 90 V in 1.5% (w/v) in Basica LE Prona agarose in 1XTBE gels. 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas) was used as a molecular size standard. Gels were stained in 0.5 mg of ethidium bromide and 500 ml of distilled water for 20 min in a covered container; they were destained in distilled water for 5 min and images were captured by TIFF files using the Gel Doc XR digital imaging system (Bio-Rad).

Reproducibility study

DNA extraction and RAPD-PCR amplification were performed at least two times, on several days. The *S. thermophilus* strains used for the optimization were: Yo-mix 410-3, S1-3, K1-15, N4-3, K1-31 with XD9 primer, N8-2, S1-3, K1-15 with OPI-02 MOD primer and K1-7, N5-4, K1-1, S1-3, N2-1, K1-15, N8-2 with M13 primer. Then, the optimum components' concentrations of PCR reaction mixture obtained were applied for amplification of the following *S. thermophilus* strains: N6-1, LMG18311 (DNA extraction was performed three times for *S. thermophilus* LMG 18311), K1-22, N6-2, S1-1, K1-26, K1-12, N3-1. The experiment was repeated three times, with the three primers, on several days.

About five months after optimization experiments, the RAPD-PCR amplification was performed with the three primers again. Six strains were tested for each primer as follows: N6-1, LMG18311, K1-22, N6-2, S1-1, K1-26 with OPI-02MOD primer and XD9 primer. The amplification was carried out with *S. thermophilus* strains, LMG18311, K1-12, N3-1, K1-31, N4-3, Yo-mix 410-3, for M13 primer.

RESULTS

Optimization of RAPD protocol

In order to optimize RAPD-PCR method, for *S. thermophilus* strains, several concentrations of template DNA, Taq DNA polymerase and primers were tested. The concentrations of PCR mixture selected were optimized according to their relative effects on RAPD amplifications in terms of the highest number and intensity of bands, the generation of clear, scorable and reproducible amplified products.

The ratio of the primer concentration to DNA template concentration is one of the critical factors affecting RAPD profiles and reproducibility (Thangaraj et al., 2011; Tyler et al., 1997; Davin-Regli et al., 1995). The titer of the template DNA concentration should be carefully determined against a fixed primer concentration to obtain ideal conditions (Tyler et al., 1997).

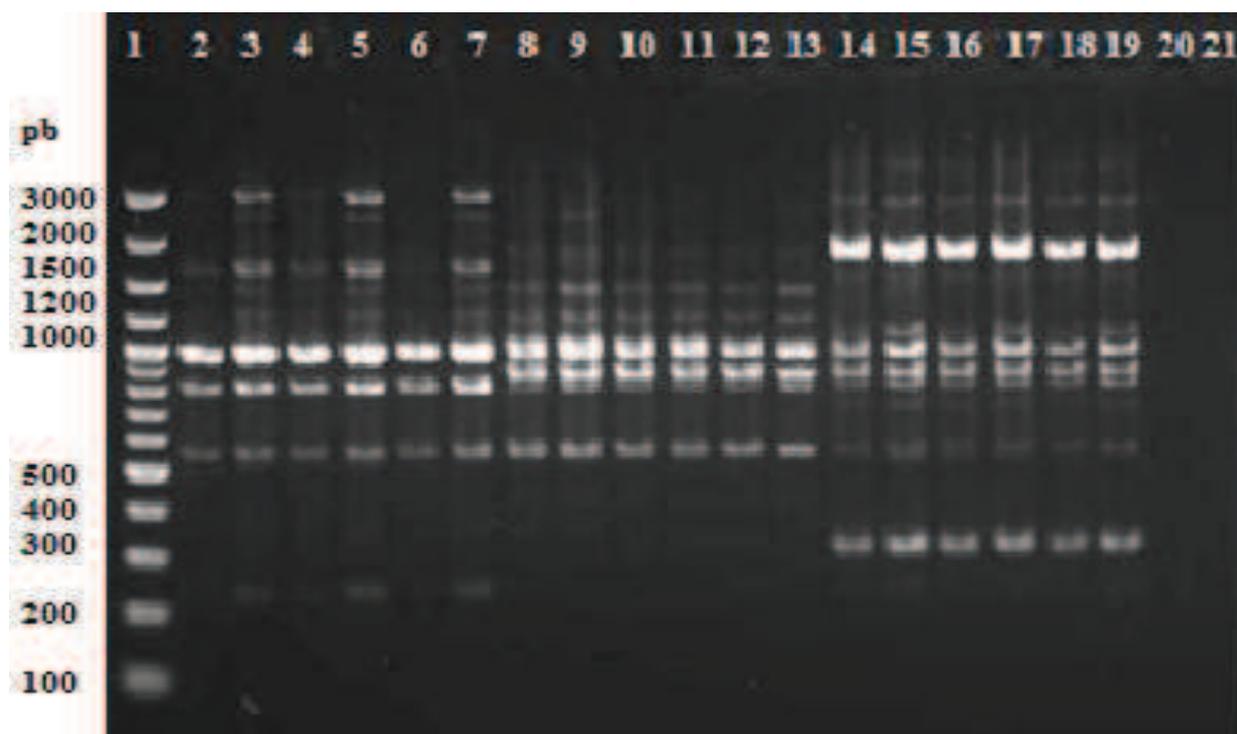


Figure 1. RAPD profiles of *S. thermophilus* strains with $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ of OPI-02 MOD primer; 1, Molecular size marker; 2, N8-2 strain, 80 ng of DNA template, 1.3 U of Taq DNA polymerase; 3, N8-2 strain, 80ng of DNA template, 2.5 U of Taq DNA polymerase; 4, N8-2 strain, 100 ng of DNA template, 1.3 U of Taq DNA polymerase; 5, N8-2 strain, 100 ng of DNA template, 2.5 U of Taq DNA polymerase; 6, N8-2 strain, 150 ng of DNA template, 1.3U of Taq DNA polymerase; 7, N8-2 strain, 150 ng of DNA template, 2.5 U of Taq DNA polymerase; 8, S1-3 strain, 80ng of DNA template, 1.3 U of Taq DNA polymerase; 9, S1-3 strain, 80 ng DNA template 2.5 U of Taq DNA polymerase; 10, S1-3 strain, 100 ng of DNA template, 1.3 U of Taq DNA polymerase; 11, S1-3 strain, 100 ng of DNA template, 2.5 U of Taq DNA polymerase; 12, S1-3 strain, 150 ng of DNA template, 1.3 U of Taq DNA polymerase; 13, S1-3 strain, 150 ng of DNA template, 2.5 U of Taq DNA polymerase; 14, K1-15 strain, 80 ng of DNA template, 1.3U of Taq DNA polymerase; 15, K1-15 strain, 80 ng of DNA template, 2.5 U of Taq DNA polymerase; 16, K1-15 strain, 100 ng of DNA template, 1.3 U of Taq DNA polymerase; 17, K1-15 strain, 100 ng of DNA template, 2.5 U of Taq DNA polymerase; 18, K1-15 strain, 150 ng of DNA template, 1.3U of Taq DNA polymerase; 19, K1-15 strain, 150 ng of DNA template, 2.5 U of Taq DNA polymerase; 20, negative control, 1.3 U of Taq DNA polymerase; 21, negative control, 2.5 U of Taq DNA polymerase.

It was observed that the use of 80, 100 and 150 ng of DNA template concentrations, with a fixed concentration ($1 \mu\text{mol l}^{-1}$) of OPI-02MOD primer provided the same result when using 1.3 or 2.5 U of Taq DNA polymerase (Figure 1). Similar RAPD profiles were obtained using 1.3 and 2.5 U of Taq DNA polymerase for S1-3 and K1-15 strains. However, there was an increase in the number of the detectable bands by increasing the concentrations of Taq DNA polymerase from 1.3 to 2.5 U for N8-2 strain. As a result, identical RAPD profiles were obtained using 2.5 and 3.5 U of Taq DNA polymerase with 100 ng of DNA template for the three strains (data not shown). Subsequently, the optimized PCR reaction mixture included: $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ OPI-02 MOD primer, 100 ng of DNA template, 2.5 U of Taq DNA polymerase, 1X PCR buffer, 2.5 mmol l^{-1} MgCl_2 , $200 \mu\text{mol l}^{-1}$ of each of the four dNTPs in a final volume of 50 μl .

Identical profiles were generated, with a fixed concentration of $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ XD9 primer, using concentra-

tions of 100 and 150 ng DNA template and 2 U of Taq DNA polymerase for the five *S. thermophilus* strains tested (data not shown). Moreover, amplification of 100 ng of DNA template, using 1.5 and 2 U Taq DNA polymerase, produced identical patterns (Figure 2A and B). Subsequently, optimized RAPD-PCR reaction contained 50 μl ; 100 ng of DNA template, $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ of XD9 primer, 2 U of Taq DNA polymerase, 1X PCR buffer, 3.5 mmol l^{-1} MgCl_2 , and $200 \mu\text{mol l}^{-1}$ of each of the four dNTPs.

Amplification bands were observed in the negative controls with ratios of M13 primer to DNA template of $0.3 \mu\text{mol l}^{-1} / 100 \text{ ng}$, $0.4 \mu\text{mol l}^{-1} / 100 \text{ ng}$, $0.5 \mu\text{mol l}^{-1} / 100 \text{ ng}$ and $1 \mu\text{mol l}^{-1} / 100 \text{ ng}$ (Figures 3A, 4A and B). However, no bands were detected, in the negative control, with a ratio of $0.2 \mu\text{mol l}^{-1} / 100 \text{ ng}$ (Figure 3B). Similar RAPD profiles were obtained with ratios of M13 primer to template DNA of $0.2 \mu\text{mol l}^{-1} / 100 \text{ ng}$, $0.3 \mu\text{mol l}^{-1} / 100 \text{ ng}$ and $0.4 \mu\text{mol l}^{-1} / 100 \text{ ng}$ (Figure 3A and B).

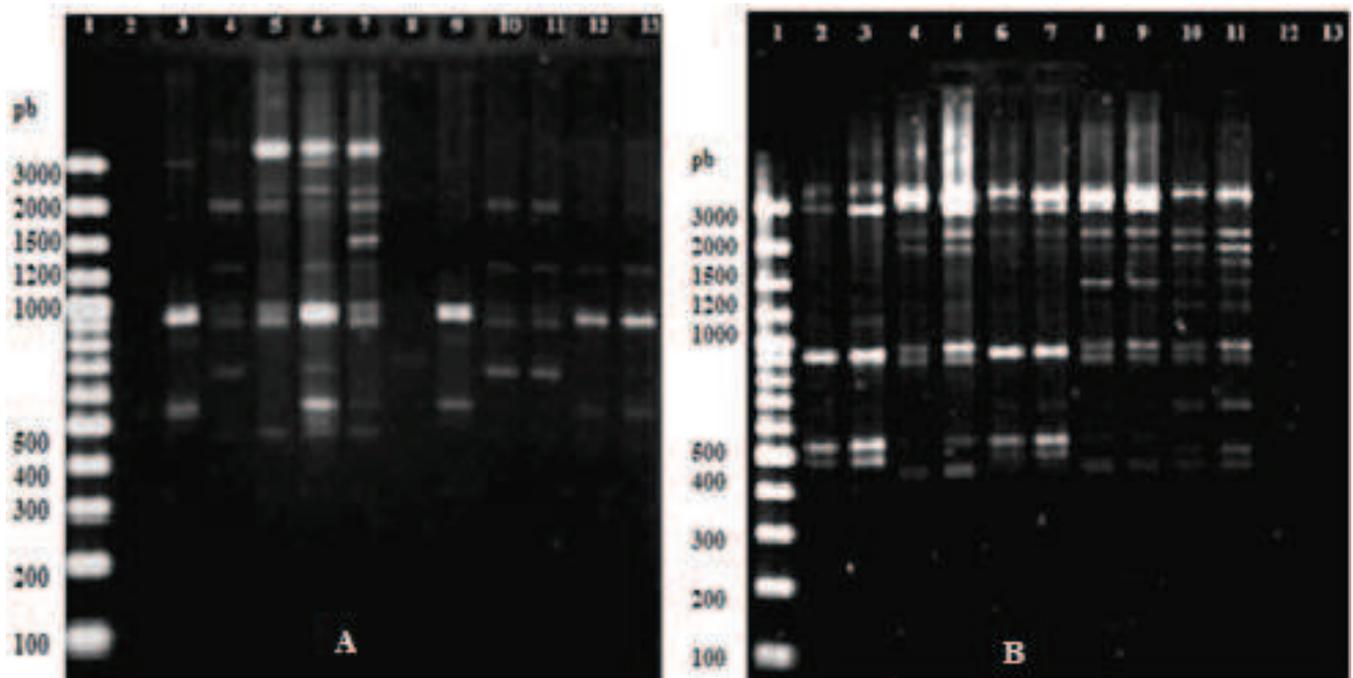


Figure 2. (A) RAPD profiles of *S. thermophilus* strains with $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ of XD9 primer, 100 ng of DNA template, 1.25 U of Taq DNA polymerase. 1, molecular size marker; 2, negative control; 3, 410-3 strain; 4, K1-31 strain; 5, S1-3 strain; 6, K1-15 strain; 7, N4-3 strain; 8, negative control; 9, 410-3 strain; 10, K1-31 strain; 11, K1-31 strain; 12, K1-15 strain; 13, K1-15 strain. **(B)** RAPD profiles of *Streptococcus thermophilus* strains with $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ of XD9 primer, 100 ng of DNA template; 1, molecular size marker; 2, 410-3 strain, 1.5 U of Taq DNA polymerase; 3, 410-3 strain, 2 U of Taq DNA polymerase; 4, S1-3 strain, 1.5 U of Taq DNA polymerase; 5, S1-3 strain, 2 U of Taq DNA polymerase; 6, K1-15 strain, 1.5 U of Taq DNA polymerase; 7, K1-15 strain, 2 U of Taq DNA polymerase; 8, N4-3 strain, 1.5 U of Taq DNA polymerase; 9, N4-3 strain, 2 U of Taq DNA polymerase; 10, K1-31 strain, 1.5 U of Taq DNA polymerase; 11, K1-31 strain, 2 U of Taq DNA polymerase; 12, negative control, 1.5 U of Taq DNA polymerase; 13, Negative control, 2 U of Taq DNA polymerase.

Therefore, $0.2 \mu\text{mol l}^{-1}$ of M13 primer, 100 ng of bacterial DNA and 1 U Taq DNA polymerase were chosen as optimum conditions since no bands were detected in the negative control under these conditions (Figure 3B). Moreover, using 1 and 1.5 U of Taq DNA polymerase yielded identical patterns for all tested strains (result not shown). As a result, the optimized PCR reaction mixture included 100 ng of bacterial DNA, 1X PCR buffer, 3 mmol l^{-1} MgCl_2 , 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of each of the four dNTPs, $0.2 \mu\text{mol l}^{-1}$ of M13 primer and 1 U Taq DNA polymerase.

The reproducibility of RAPD profiles

The reproducibility of band patterns generated using the optimized parameters was confirmed, in several days, for the three primers, M13, OPI-02 MOD, XD9.

Five months later, results of RAPD PCR amplification performed with the same three primers were compared with those already obtained. Six strains tested produced identical patterns with OPI-02MOD primer, while four from the six strains produced identical patterns with M13 primer and only one was identical with XD9 primer. RAPD profiles of N4-3 strain and Yo-mix 410-3 strain showed

two extra faint bands in their profiles, with M13 primer as compared to those obtained in the former five months. RAPD profiles of LMG 18311, Yo-mix 410-3, N6-2, K1-26 and N6-1 strains showed one, three, one, two and four extra faint bands, respectively with XD9 primer (M13 primer; Figure 5).

DISCUSSION

The different concentrations of the RAPD mixture tested had different degrees of influence on the RAPD patterns and their reproducibility. An efficient protocol for RAPD analysis should be reasonably resistant to variations in template DNA concentrations (Skorić et al., 2012).

In our experiments, identical profiles were reached over a range of different concentrations of template DNA. Similar observations have been reported by Skorić et al. (2012) and Wolff et al. (1993). For instance, chrysanthemum DNA amplification was relatively constant between a large range of 1 and 500 ng template DNA (Wolff et al., 1993). With regard to the Taq polymerase concentration, a threshold concentration, in which the RAPD profiles were identical, was noticed; same result has been re-

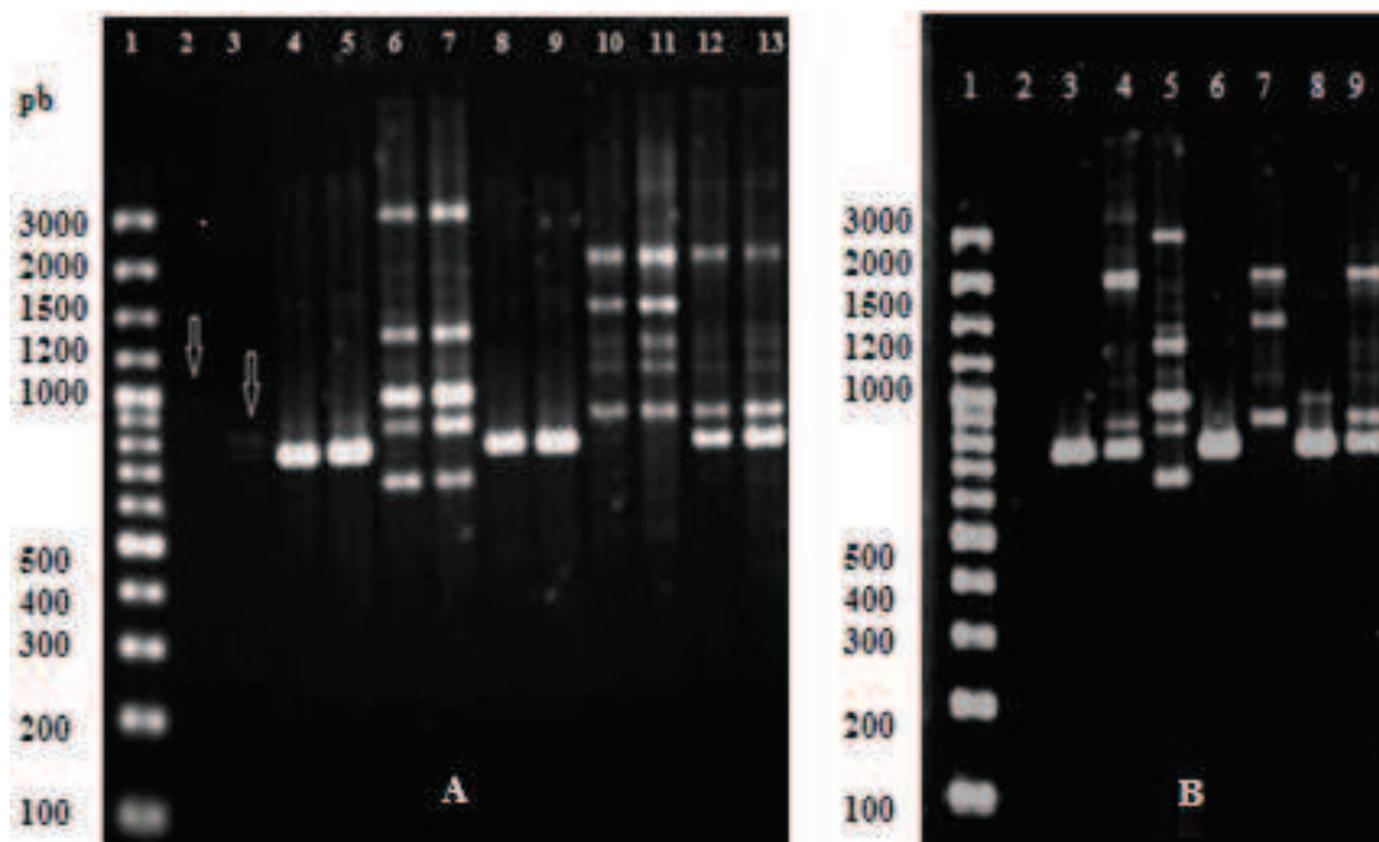


Figure 3. (A) RAPD profiles of *S. thermophilus* strains with M13 primer, 100 ng of DNA template, 1 U of Taq DNA polymerase. 1, Molecular size marker; 2, negative control, 0.3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of primer; 3, negative control, 0.4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of primer; 4, K1-7 strain, 0.3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of primer; 5, K1-7 strain, 0.4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of primer; 6, N5-4 strain, 0.3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of primer; 7, N5-4 strain, 0.4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of primer; 8, K1-1 strain, 0.3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of primer; 9, K1-1 strain, 0.4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of primer; 10, S1-3 strain, 0.3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of primer; 11, S1-3 strain, 0.4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of primer; 12, N2-1 strain, 0.3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of primer; 13, N2-1 strain, 0.4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of primer. **(B)** RAPD profiles of *S. thermophilus* strains with M13 primer, 100 ng of DNA template, 1 U of Taq DNA polymerase, 0.2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of primer. 1, Molecular size marker; 2, negative control; 3, K1-7 strain; 4, N2-1 strain; 5, N5-4 strain; 6, K1-1 strain; 7, S1-3 strain; 8, K1-15 strain; 9, N8-2 strain.

ported (Skorić et al., 2012; Fraga et al., 2005). When using lower concentrations of template DNA or Taq DNA polymerase, no visible amplification or lower number and intensity of bands were detected (results not shown).

In this work, the effect of primer concentration on the obtained results was noticed, particularly with M13 primer; whereas, identical profiles were observed using a range of ratios of primer to DNA template from 0.2 to 0.4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ / 100 ng. At lower ratio of 0.1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ / 100 ng, different RAPD profiles were observed for N5-4, S1-3 and N2-1 strains (result not shown). In addition, at higher ratio of M13 primer to DNA template of 0.5 and of 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ / 100, extra bands were generated. This was clear when comparing profiles of N8-2 strain in Figures 3B (lane 9), 4A (lane 9) and 4B (lane 5). The same observation was demonstrated with profiles of K1-15 strain in Figures 3B (lane 8), 4A (lane 13) and 4B (lane 7). At higher ratio of primer/template, rare or inaccessible sites can be amplified (Davin-Regli et al., 1995). In this case, bands could also result from the increase in weaker mismatch

annealing of the primer to the target (Tyler et al., 1997; Caetano-Anolles et al., 1992). In addition, at higher ratio of primer/DNA template, the amplification of artefactual bands in the control samples without DNA has also been mentioned (William et al., 1990). This phenomenon was observed in the results with ratios of M13 primer to DNA template of 0.3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ / 100 ng, 0.4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ / 100 ng, 0.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ / 100 ng and 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ / 100 ng (Figure 3A, 4A and 4B). This can be explained by the possible contaminants or nonspecific products (primer-dimers) (Singh et al., 2010; Harini et al., 2008; Padmalatha and Prasad, 2006; Raghunathachari et al., 2000; Pan et al., 1997). The first possibility was excluded since it was checked by repeating our experiment with new reagents. Therefore, the second possibility is the most probable. Moreover, the artefactual bands in the negative control and extra bands (of N8-2 and K1-15 strains) increased by raising the concentration of M13 primer.

Therefore, the extra bands of N8-2 K1-15 strains generated with high M13 primer concentration could not

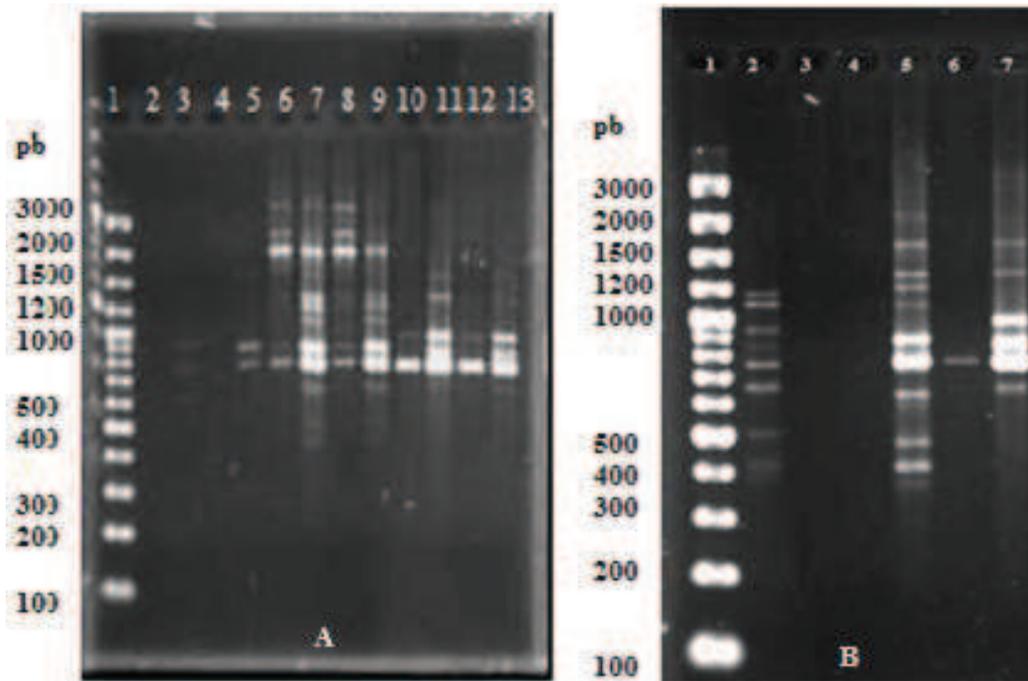


Figure 4. (A) RAPD profiles of *S. thermophilus* strains with 0.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of M13 primer. (5) Negative control; (9), N8-2 strain; (13), K1-15 strain. (B) RAPD profiles of *S. thermophilus* strains with 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of M13 primer. (2), negative control; (5), N8-2 strain; (7), K1-15 strain.

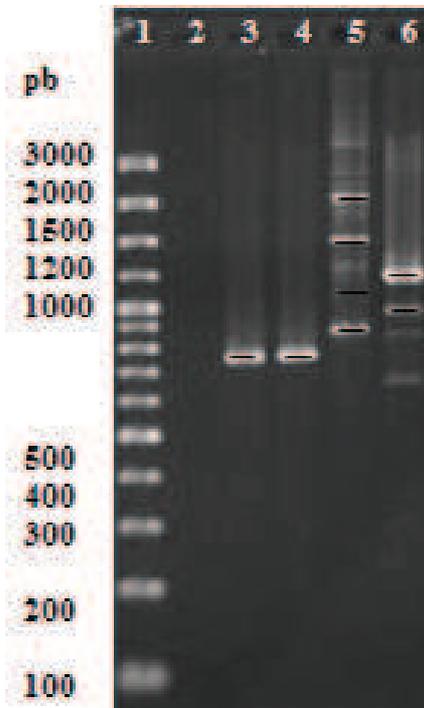


Figure 5. RAPD profiles of *S. thermophilus* strains with M13 primer was generated five months later. The black lines indicate the reproducible bands detected five months before. We can see the extra faint bands of strains (5), N4-3 and (6), Yo-mix 410- 3 without black lines.

be only due to the amplification of rare or inaccessible sites on DNA. The primer-dimers phenomenon could also affect RAPD strain's profiles. These nonspecific products could be amplified in the presence of a DNA template, as has been already reported by Pan et al. (1997).

The optimized conditions led to RAPD pattern's bands reproducibility with OPI-02MOD, M13, XD9 primers. Such bands correspond to perfect annealing sites amplified with good efficacy or present in multiple copies in the genome (Davin-Regli et al., 1995). When the experiments were repeated five months later, identical strains patterns were generated with OPI-02 MOD. However, the reproducible bands persisted in the profiles that have resulted from amplification with XD9 and M13 primers with the appearance of extra faint bands. This cannot be due to the contamination or degradation of stocked DNA over time (Black et al., 1992). Whereas, the five month's DNA samples gave identical patterns with OPI-02 MOD, contrary to XD9 primer. Moreover, the amplification of new extracted DNA of *S. thermophilus* LMG 18311, with XD9 primer, generated an extra faint band. However, it yielded identical profiles with OPI-02 MOD and M13 primers.

The study by Saunders et al. (2001) demonstrated that thermal cycler calibration and temperature monitoring have an important effect on RAPD profiles reliability and repeatability. The extra faint bands obtained could be a consequence of slight variation in annealing temperature or calibration of the thermocycler generating the amplifi-

cation of nonspecific DNA target sites.

In conclusion, OPI-02 MOD primer seemed to be the most reproducible, followed by M13 primer. XD9 primer showed the worst performance. Authors noted that, some primers are extremely reliable whereas others gave notoriously inconsistent results (Tyler et al., 1997; Grosberg et al., 1996; Bielawski et al., 1995; Penner et al., 1993). This could be explained by the presence of high amount of specific target sequence for OPI-02 MOD primer on *S. thermophilus* DNA template as compared to nonspecific sequences, and this could have a major effect on its good reproducibility.

One of the purposes of optimizing RAPD-PCR conditions is to increase the specificity and efficiency of primer-template interactions. Higher number of specific sites than nonspecific sites should be reasonably in favor of primer/specific target site interaction. Subsequently, varying slightly the temperature or calibration of thermocycler causes RAPD-PCR intralaboratory or interlaboratory non reproducibility. However, such slight variations may not have a significant consequence on the reproducibility for such primer/DNA template (OPI-02 MOD/*Streptococcus thermophilus* DNA). Ramos et al. (2008) concluded that, at least in part, problems of repeatability attributed to RAPD markers could be due to bias in the selection of loci and primers and not necessarily the RAPD technique per se.

The reproducibility problem of RAPD-PCR can be overcome, in principle, by using rigid laboratory protocols and doing repeatability tests. The purpose of such tests is to repeat the analyses and retain only the bands that appear in both initial and later screenings for further analyses (Telles and Soares, 2007; Santos et al., 2007). Ramos et al. (2008) developed a procedure to optimize repeatability and avoid bias in sampling loci for genetic analyses based on RAPD data.

Using such reproducible OPI-02 MOD primer in studying *S. thermophilus* genetic diversity, at different laboratories or at different time periods within the same laboratories can be efficient. The strict standardization of RAPD-PCR conditions has to be applied using the same brand of Taq DNA polymerase, same model of Thermocycler, controlling the temperature and calibration of the Thermocycler.

REFERENCES

- Andrighetto C, Borney F, Barmaz A, Stefanon B, Lombardi A (2002). Genetic diversity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian traditional cheeses. *Int. Dairy J.* 12:141-144.
- Bielawski JP, Noack K, Pumo DE (1995). Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA. *Bio-techniques* 18:856-860.
- Black WC, Duteau NM, Puterka GJ, Nechols JR, Pettorini JM (1992). Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bull. Entomol. Res.* 82:151-159.
- Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1992). Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol. Gen. Genet.* 235:157-165.
- Davin-Regli A, Abed Y, Charrel RN, Bollet C, de Micco P (1995). Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. *Res. Microbiol.* 146:561-568.
- De Vuyst L, Tsakalidou E (2008). *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *Int. Dairy J.* 18:476-485.
- Fraga J, Rodriguez J, Fuentes O, Fernandez-Calienes A, Castex M (2005). Optimization of Random Amplified polymorphic DNA techniques for use in genetic studies of Cuban Triatominae. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 47(5):295-300.
- Giraffa G, Paris A, Valcavi L, Gatti M, Neviani E (2001). Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J. Appl. Microbiol.* 91:937-943.
- Grosberg RK, Levitan DR, Cameron BB (1996). Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR Markers: A random primer for the nervous and novice. In *Molecular Zoology Advances, Strategies, and Protocols*, Eds., J. D. Ferraris and S. R. Palumbi. John Wiley and Sons Publishers, New York.
- Harini SS, Leelambika M, Shiva Karmeswari MN, Sathyanarayana N (2008). Optimization of DNA isolation and PCR-RAPD methods for molecular analysis of *Urginea indica* (Kunth). *Int. J. Integr. Biol.* 2:138-144.
- Hols P, Hancy F, Fontaine L, Grossiord B, Prozzi D, Leblond-Bourget N, Decaris B, Bolotin A, Delorme C, Dusko Ehrlich S, Guedon E, Monnet V, Renault P, Kleerebezem M (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:435-463.
- Huey B, Hall J (1989). Hypervariable DNA fingerprinting in *E. coli* minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.* 171:2528-2532.
- Lazzi C, Bove CG, Sgarbi E, Gatti M, La Gioia F, Torriani S, Neviani E, (2009). Application of AFLP fingerprint analysis for studying the biodiversity of *Streptococcus thermophilus*. *J. Microbiol. Meth.* 79:48-54.
- Mora D, Fortina MG, Parini C, Ricci G, Gatti M, Giraffa G, Manachini PL (2002). Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J. Appl. Microbiol.* 93:278-287.
- Morandi S, Brasca M (2012). Safety aspects, genetic diversity and technological characterization of wild-type *Streptococcus thermophilus* strains isolated from north Italian traditional cheeses. *Food Control.* 23 (1):203-209.
- Moschetti G, Blaiotta G, Aponte M, Catzeddu P, Villani F, Deiana P, Coppola S (1998). Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *J. Appl. Microbiol.* 85:25-36.
- O'Sullivan TF, Fitzgerald GF (1998). Comparison of *Streptococcus thermophilus* strains by pulsed field gel electrophoresis of genomic DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 168:213-219.
- Padmalatha K, Prasad MNV (2006). Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *Afr. J. Biotechnol.* 5:230-234.
- Pan YB, Burner DM, Ehrlich KC, Grisham MP, Wei Q (1997). Analysis of Primer-Derived, nonspecific amplification products in RAPD-PCR. *Biotechniques* 22(6):1071-1077.
- Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K, Laroche A, Scoles G, Molnar SJ, Fedak G (1993). Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Appl.* 2(4):341-345.
- Ragunathachari P, Khanna VK, Singh US, Singh NK (2000). RAPD analysis of genetic variability in Indian scented rice germplasm (*Oryza sativa* L.). *Curr. Sci.* 79(7):994-998.
- Ramos JR, Telles MPC, Diniz-Filho JAF, Soares TN, Melo DB, Oliveira G (2008). Optimizing reproducibility evaluation for random amplified polymorphic DNA markers. *Genet. Mol. Res.* 7(4):1384-1391.
- Rizzotti L, La Gioia F, Dellaglio F (2009). Characterization of tetracycline-resistant *Streptococcus thermophilus* isolates from Italian Soft Cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (12):4224-4229.
- Santos RP, Angelo PCS, Quisen RC, Oliveira CL, Sampaio PTB (2007).

- RAPD em Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke): adaptação do método para coleta de amostras in situ, ajuste das condições de PCR e apresentação de um processo para selecionar bandas reprodutíveis. *Acta Amazonica* 37:253-260.
- Saunders GC, Dukes J, Parkes HC, Cornett JH (2001). Interlaboratory study on thermal cycler performance in controlled PCR and random amplified polymorphic DNA analyses. *Clin. Chem.* 47(1):47-55.
- Singh B, Yadav R, Singh H, Singh G, Punia A (2010). Studies on Effect of PCR-RAPD Conditions for Molecular Analysis in *Asparagus* (Satawari) and *Aloe Vera* Medicinal Plants. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 4(12):6570-6574.
- Singh S, Goswami P, Singh R, Heller KJ (2009). Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species. *Food Sci. Technol.* 42:448-457.
- Skorić M, Šiler B, Banjanak T, Živković J, Dmitrović S, Mišić D, Grubišić D (2012). The reproducibility of RAPD profiles: effects of PCR components on RAPD analysis of four *Centaureum* species. *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 64 (1):191-199.
- Telles MPC, Soares TN (2007). DNA Fingerprinting no Estudo de Populações de Plantas do Cerrado. In: *Recursos Genéticos e Conservação de Plantas Medicinais do Cerrado* (Pereira AMS, ed.). Editora Legis Summa; FAPESP, Ribeirão Preto 109-145.
- Thangaraj M, Prem V, Ramesh T, Lipton AP (2011). RAPD fingerprinting and demonstration of genetic variation in three pathogens isolated from Mangrove environment. *Asian J. Biotechnol.* 3(3):269-274.
- Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Johnson WM (1997). Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 35 (2):339-346.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Wolff K, Schoen ED, Peters-Van Rijn J (1993). Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum. *Theor. Appl. Genet.* 86:1033-1037.

Phenotypic and Whole Cell Protein Analysis by SDS-PAGE for Identification of Dominant Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Milk

Fatima Ghazi, Djamal Eddine Henni, Zineb Benmechernene and Mebrouk Kihal

Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology,
Faculty of Sciences, Oran University, B.P. 16, Es-Senia, Oran 31100, Algeria

Abstract: Phenotypic identification of 21 representative strains revealed the presence of the following species: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* and *Lactobacillus plantarum*. In order to validate the previous results, whole cell protein patterns were obtained using Sodium Dodecyl Sulphate Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of these lactic acid bacteria strains, were analysed by calculating the coefficients of similarity (>100) for each two strains which were 80.7% and 78% for next couple of strains (6, 13) and (43, L₄) that were identified phenotypically as *Weissella paramesenteroides* and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, respectively. The coefficients of similarity (>100) between one strain of *Leuconostoc mesenteroides* and one strain of *Weissella paramesenteroides* were 36%, 48%, 44.4%, 48.6%, 44.4% and 48.6%, for the following couples (L₄, 13), (L₄, 6), (43,13), (43,6), (27,13) and (27, 6), respectively, in agreement with distant phylogenetic relationship between *Leuconostoc mesenteroides* and *Weissella paramesenteroides*. The SDS-PAGE method allowed clarifying some ambiguous points in phenotypic identification. It had corroborate, complete and correct phenotypic identification, although, further study is required to accurate it.

Key words: Lactic acid bacteria • Identification • Phenotypic method • SDS-PAGE • raw milk • *Leuconostoc*

INTRODUCTION

During the last decade studies concerning development of new dairy products have focused on selection of new strains isolated from wild niches that are able to increase biodiversity and restore the unique characteristics of traditional dairy products [1].

Lactic acid bacteria (LAB) are Gram positive and usually catalase negative, grow under anaerobic conditions but they are aerotolerant, non-spore forming and have a fermentative sugar metabolism with lactic acid as a major final product. They have a great economic importance in dairy and other fermented food industries [2-4].

Lactic acid bacteria consist of a wide range of genera including a considerable number of species. Traditionally, they were divided into four genera, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus*. However, a considerable change in the taxonomy of lactic acid bacteria was observed during the last years [5].

Currently, the group of LAB in foods exist in the following genera *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Alloiooccus*, *Globicatella* and *Dolosigranulum* [6].

Phenotypic identification of LAB in dairy products are based mainly on morphological, physiological and biochemical characteristics, which are useful and indispensable tools that have been commonly used [7].

Although, phenotypic tests provide some evidence of metabolic capabilities, there are some problems, such as a lack of reproducibility and a lack of discriminatory power. Designation of certain neotype strains based only on phenotypic characteristics gave confused results which were resolved only by using molecular technique [8]. Recently, genetic techniques such as the mol % G+C contents of the DNA, DNA: DNA hybridization studies and structures and sequence of rRNA have been developed in order to get more consistent and accurate

identification of LAB [9-11]. Ogier *et al.* [9] observed a spatial distribution of bacteria species in cheese, based on metabolite availability and competition between bacteria. The bacteria of the cheese surface generally correspond to high G+C content genomes, whereas bacteria present in the core generally have low G+C content genomes.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of whole cell protein is widely used for identification, since it offers the advantage to have a good level of taxonomic resolution at species and subspecies. Molecular methods have been used successfully to identify lactic acid bacteria isolated from different fermented foods [12-14]. The interest in LAB occurring in milk is primarily due to the biotechnological potential of new species.

The use of starters improved the technological quality of dairy products, but at the same time limited their biodiversity as well as the organoleptic variation of the end products. Therefore, an increasing demand exists for new strains that show desirable effects on the product characteristics [15].

The objective of this study is to identify the LAB isolated from Algerian raw milk using phenotypic methods and whole cell proteins fingerprinting.

MATERIALS AND METHODS

Sampling: Raw milk samples (cow, goat and camel) were collected from Oran, Mascara and Tindouf regions between June 2001 and January 2002. The Roquefort French cheese was also used to isolate LAB.

Isolation, Purification and Growth Conditions of Bacterial Strains: In order to select the *Leuconostoc* species, the strains have been isolated on MRS agar at pH 6.5, supplemented with 25 µg/ml of vancomycin [16] (MRSv) and were incubated at 28°C for 48h. Other LAB has been isolated on MRS agar without the presence of vancomycin at pH 6.5 and was incubated at 28°C and 45°C for 24h-72h. One reference strain of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (L₄) obtained from Biotechnology-Microbiology Laboratory of ENSBANA, Dijon (France), has been used in this study. Morphologically, different colonies were selected and purified in the same previous conditions. A total of 62 isolates which were Gram positive and catalase negative, isolated from raw milks and Roquefort French cheese, have been retained.

Stock cultures were routinely maintained in MRS agar slants at 4°C and subcultured every 15 days. For long-term storage, frozen samples (-20°C) were prepared in sterile skim milk with 30% (v/v) glycerol. Enumeration of colonies of LAB in raw coagulate milk samples was performed.

Strains Identification: On the basis of morphological criteria, 21 dominant strains were chosen for this study. They were tested for: The morphological aspect, the proteolytic activity on PCA at 2% of skim milk, the production of CO₂ from glucose, the growth at different temperatures 10, 15, 37 and 45°C, the thermotolerance at 60°C for 30min, the growth at 6.5% NaCl and at pH 9.6, the hydrolysis of arginine, the dextran production which was detected at 10 % sucrose agar medium and the hydrolysis of aesculin was tested with 0.5% (w/v) aesculin. The citrate utilization, in the presence of glucose, was performed on the KMK medium [17].

The production of acetoin from glucose was determinate using Voges-Proskauer test on Clak and Lubs broth. All isolates were tested for the fermentation of the following carbohydrates: L(+) arabinose, D(-) ribose, D(+) xylose, dulcitol, glucose, galactose, fructose, D-mannose, D-mannitol, sorbitol, lactose, maltose, sucrose, D(+) cellobiose, D(+) raffinose and L(+) rhamnose (4, 5).

The identification of LAB isolates was referred to the following authors: Garvie [18], Collins *et al.* [19] for genus *Leuconostoc* and *Weissella*. Garvie [20] for *Pediococcus*. Farrow and Collins [21], Schleifer and Kilpper-Bälz [22], Schleifer *et al.* [13], for *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Enterococcus*. Garvie [20] for *Lactobacillus* Samelis *et al.*, [12].

Electrophoresis SDS-PAGE of Whole Cell Protein Extracts: Only 14 representative species have been chosen for closer phenotypic profiles.

Sample Preparation: Cultures were grown in MRS broth, for 18h-48h and were streaked on buffered MRS agar (phosphate buffer 0.1M, pH 6.8) then were incubated for 18h to 48h. Cells were collected and resuspended in distilled water, then, harvested by centrifugation at 10000 rpm for 10min. The pellet was washed twice with distilled water and 50mg from the pellet was recuperated for each sample. Cells were sonicated at 30W for 30 sec and then incubated on ice for 20 sec. This performance was repeated twice. Subsequently, samples were resuspended in 0.9ml phosphate buffer 0.1M (pH 6.8), containing 5%

β -mercaptoethanol plus 5% sucrose, then an 0.1ml SDS (20%) was added to the suspension and the mixture was heated at 100°C for 2min. After cooling the mixture on ice and centrifuging at (10000 rpm for 10 min), the supernatant was recuperated and preserved at -20°C [23].

Protein concentration in the supernatant was measured by Bradford assay, using bovin serum albumin as standard. A standard protein solution was prepared with serum albumin (68kDa), casein (24kDa) and β -lactoglobulin (18kDa).

SDS-PAGE Electrophoresis: Cell-free extracts were subjected to SDS-PAGE electrophoresis on vertical slabs gel. The polyacrylamide gels were consisted of resolving gel 12% and stacking gel 5%. The electrode buffer was 0.3% (w/v) Tris, 1.44% (w/v) glycine and 0.1% (w/v) SDS (pH 8.3). A volume of sample containing 50 μ g of proteins was layered on top of gel and 10-20 μ l of loading sample buffer [0.01% (w/v) Bromophenol blue, 2% (w/v) SDS in buffer phosphate 1M (pH 6.8)] was added to each layer as a visible marker. Electrophoresis was performed at current of 50 mA and 120V. Proteins were fixed by immersing the gels in an aqueous of 10% (v/v) trichloroacetic solution for 1h and stained overnight in coomassie blue stain [0.25% (w/v) coomassie blue R-250, 50% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid]. The excess stain was washed out by distaining the gel with a solution of 25% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid [23].

Analysis of Protein Patterns: Molecular weight of proteins in electrophoregrams and coefficients of similarity (Jaccard coefficient) were calculated.

$$S_{ab} = N_s / N_{s+Nd}$$

S_{ab}: coefficients of similarity between two strains (a) and (b). N_s: Number of proteins having similar molecular weight between two strains (a) and (b) in electrophoregram. N_d: Number of proteins having different molecular weight between two strains (a) and (b) in electrophoregram.

RESULTS AND DISCUSSION

Results of the enumeration of lactic acid bacteria on MRS and MRSv have shown that the proportion of mesophilic lactic acid bacteria resisting to vancomycin are respectively: 7.3%, 0.265% and 1.7% from raw milk

of goat, cow and camel. Mathot *et al.* [16] had mentioned the resistance of *Leuconostoc* strains and the sensitivity of *Lactococcus* strains towards vancomycin at this concentration. However resistance to this antibiotic is a among the general features of *Leuconostoc*, although it has been shown that *Pediococcus* and *Lactobacillus* are also vancomycin resistant. The 21 isolates were identified as belonging to the genus *Leuconostoc-Weissella* (10), *Lactobacillus* (8), *Lactococcus* (1), *Pediococcus* (1) and *Enterococcus* (1).

Phenotypic Identification of Lactic Acid Bacteria: Firstly, we have limited our research to the group of LAB that can be found in milk and dairy products. Strains numbering 17, 2, 13, 6, 43 and 27 isolated on MRSv and strains 19, 39 on MRS without vancomycin have the coccoid rod cells and occurred in pairs, in short chains or little mass. They were heterofermentative mesophilic, they did not hydrolyse arginine and they were considered as *Leuconostoc* (Table 1). Production of dextran from sucrose is an important character [18] to differentiate *Leuconostoc* species. Only two strains L₄ (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*) and 43 had shown this property. A weak dextran production was detected with the 43 strain. Devoyod and Poullain [24] had also isolated the species of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* from dairy products which had also shown a weak dextran production. The *Leuconostoc* dextran (+) can be differentiated by the ability to ferment L-arabinose [25]. This reaction was negative with the strains L₄, 43, which were identified as *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Table 1). On the basis of sugar fermentation patterns, we could differentiate them into 43 (xylose⁻, mannitol⁻, raffinose⁺) and L₄ (xyl⁺, mannit⁺, raff⁻).

The *Leuconostoc cremoris* has a limited sugar fermentation profile and does not grow at 37°C. This is not the case of strains 17, 2, 13, 6, 27, 19 and 39 which doesn't produce dextran and doesn't ferment fructose, sucrose, maltose and mannose (Table 1). It is difficult to distinguish between *Leuconostoc lactis* and *Leuconostoc paramesenteroides* by their sugar fermentation patterns [25]. However, our leuconostocs were assigned to *Leuconostoc paramesenteroides* (currently *Weissella paramesenteroides*; Collins *et al.* [19]). Furthermore, they can be divided into four groups: Group 1: 27 (arabinose⁺, xylose⁻, Cellobiose⁻, raffinose⁻, mannitol⁺). Group 2: 6, 1, 2, 17, 39 (ara⁻, xyl⁺, Celb⁺, raff⁺ mannit⁻). Group 3: 13 (ara⁻, xyl⁻, Celb⁻, raff⁺, mannit⁻). Group 4: 19 (ara⁻, xyl⁻, Celb⁺, raff⁺, mannit⁻).

Table 1 : Physiological and biochemical properties of coccoid and lactic acid bacteria.

Tests	Strains												
	17	39	2	19	13	6	38	21	43	27	1	L ₄	20
Fermentative metabolism	ht	ht	ht	ht	ht	ht	hm	hm	ht	ht	ht	ht	hm
Growth in NaCl 6,5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Growth at 45°C	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Growth at 37°C	±	±	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+
Growth at 10°C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Growth at 50°C	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	+	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
Thermotolerance	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Growth in pH 9,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Hydrolysis of arginine	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Citrate (KMK)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
Dextran	-	-	-	-	-	-	Nt	Nt	±	-	-	+	Nt
Hydrolysis of aesculin	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Proteolytic activity	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sugar fermentation :													
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+) xylose	+	+	+	-	-	+	±	-	-	-	+	+	-
L(+) arabinose	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+
L(+) rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	±	±	+	±	-	+	+	+	±	-	±	+	+
Sucrose	+	+	+	+	±	+	-	+	+	+	+	+	+
D mannose	±	±	±	+	±	+	+	+	±	+	+	+	+
D mannitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	±	-	+	±
D(-) ribose	+	+	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+) raffinose	+	+	+	+	+	+	-	±	+	-	+	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Symbols : +; positive reaction at 24h or 48h , -; negative reaction, ±; weak and / or delayed reaction (the time of reaction exceed 48h), ht; heterofermentative metabolism, hm; homofermentative metabolism, Nt; not tested, KMK; Kempler and Mac Kay media contained 3g/l of yeast extract, VP; Voges Proskauer test (positive result detected after incubation 2-3 days, except, strain 21 at 6h)

Since the Ribose fermentation is a distinguishable character between *Leuconostoc lactis* and *Weissella paramesenteroides* (8). All the strains, mentioned previously, are characterised by ribose fermentation and they belong to *Weissella paramesenteroides*. Moreover, hence The strains 27, 13, 19 and all strains from group 2 are a variable sugar (Cellobiose, xylose, mannitol, arabinose and raffinose) (Table 1) fermentation, therefore, they cannot belong to the species of *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

It should be noted that one *Weissella paramesenteroides* number 27, was citrate defective variant. The instability of plasmid encoded citrate metabolism is known in the case of *Leuconostoc* sp. [26]. Strains 20, 21 and 38 were homofermentative cocci.

On the basis of the growth at both 10°C and 45°C, in 6.5% NaCl, pH 9.6, surviving at 60°C for 30min and the hydrolysis of arginine, the strain 20 was identified as *Enterococcus* (Table 1). Notably, the ability of *Enterococcus faecium* to ferment arabinose led to distinct it from *En. faecalis* and *En. durans* [27,28].

Except, the growth at 10°C and arginine hydrolysis, the above other tests were negative for strain 21, therefore, it is assigned to the genus *Lactococcus*. It is arginine(+) and citrate(+) and VP(+). The latter properties had suggested the identification of this strain as *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

Strain 38 had spherical cells, formed tetrads and was assigned to genus *Pediococcus*. Strain 38 was heat resisting, able to grow at 45°C but did not grow at

Table 2: Physiological and biochemical properties of lactobacilli

Tests	Strains							
	23	24	52	58	61	25	50	32
Fermentative metabolism	hm	hm	hm	hm	hm	hm	hm	hm
Growth at 45°C	+	+	+	-	+	+	+	-
Growth at 15°C	+	+	-	+	+	+	-	+
Arginine hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate (KMK)	-	-	+	+	+	-	-	-
Vp	+	+	+	+	+	-	+	+
Aesculin hydrolysis	-	-	+	+	+	-	-	-
Proteolytic activity	+	+	+	+	+	+	+	+
Sugar fermentation :								
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+) xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
L(+) arabinose	-	-	+	+	+	+	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
L(+) rhamnose	+	+	-	-	-	-	±	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	-	±	+
Sucrose	±	+	+	+	+	+	+	+
D mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
D mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+
D(-) ribose	+	+	+	+	+	±	+	+
D(+) raffinose	-	-	+	+	+	-	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+	±

Symbols : +; positive reaction at 24h or 48h, - ; negative ; reaction, ±; weak and / or delayed reaction (the time of reaction exceed 48h), ht; heterofermentative metabolism, hm; homofermentative metabolism, KMK; Kempler and Mac Kay media contained 3g/l of yeast extract, VP ; Voges Proskauer test (positive result detected after incubation 2-3 days)

temperature of 10°C, 6.5% of NaCl and pH 9.6. Contrary to *Streptococcus thermophilus*, it was arginine positive, fermented arabinose, cellobiose and did not fermented sucrose, consequently, the previous definition was confirmed, unlike to *Pc. damnosus*, which is able to grow at pH 7.0, at 37°C and at 45°C. On the other hand, *Pc. acidilactici* and *Pc. pentosaceus* are closely related species that may not be clearly differentiated by phenotypic characteristics, but they are differentiated by ADN-AND homology. On the basis of growth at 50°C, the strain 38 was identified as *Pc. acidilactici* [5,25,28]. The latter was the only *Pediococcus* (isolated from raw milk and dairy products) that tolerate this temperature.

All strains 23, 24, 52, 58, 61, 25, 50 and 32 (Table 2) were characterised as mesophilic homofermentative lactobacilli belong to the group [12,25]. These strains do not hydrolyse arginine.

The rod-shaped cells from strain 25 had a tendency to a curve. Strains 52 and 61 had shown thickest rod cells. Colonies from the strains 58, 61, 52 and 25 were easily distinguished from all the other strains. Strains 58, 61 and 52 were larger, more convex and cheesy white, however, 25 were smaller colonies, lesser convex and transparency white.

The strains 23, 24, 52, 58, 61, 50 and 32 (Table 2) were lactose positive, ribose positive, sucrose positive and sorbitol positive, that is why it cannot belong to *Lactobacillus casei*.

The fact that all those strains were sorbitol positive and able to grow at 15°C, their identification was restricted to *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*. Only *Lb. pentosus* doesn't grow at 15°C. Moreover, fermenting arabinose by strains 52, 58 and 61, it's the other argument in favour. These strains were

Table 3: Coefficients of similarity (>100) between each two strains of LAB

Strains	L ₄	13	6	43	27	52	58	32	50	23	25	38	20
13	36.0												
6	48.6	80.7											
43	78.0	44.4	48.6										
27	78.0	44.4	48.6	100.0									
52	27.1	30.2	37.2	30.6	30.6								
58	26.8	22.5	25.0	30.9	30.9	55.5							
32	29.5	18.2	27.9	30.4	30.4	77.8	52.0						
50	35.9	23.0	27.5	33.3	33.3	36.4	37.8	36.6					
23	27.5	21.0	19.5	28.6	28.6	31.8	36.0	31.7	85.2				
25	35.2	9.3	11.7	7.5	7.5	7.0	8.6	10.2	8.3	8.8			
38	19.1	18.6	22.7	11.3	11.3	31.6	22.7	22.9	14.6	6.5	2.4		
20	25.7	25.8	23.5	20.5	20.5	18.6	16.6	20.5	22.8	17.1	11.11	17.9	
21	21.1	20.8	22.0	22.2	22.2	29.6	32.6	26.9	21.5	22.4	4.2	35.4	26.2

grown at 15°C and, except 58, did not grow at 45°C. They did not ferment rhamnose, therefore, were assigned to *Lb. plantarum* or *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* and strain 58 to *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*.

Strains 23, 24, 50 and 32 were arabinose negative and rhamnose positive except strain 32 which was rhamnose negative. Also, the ability of their growth on 15°C and 45°C was observed with all the strains except with strain 32 which did not show a grow on 45°C. Thus, 23, 24, 50 were assigned to *Lb. rhamnosus* and 32 (resistant to 25µg/ml to vancomycin) to *Lb. plantarum* or *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*. Furthermore, The fermentation of raffinose can differentiate strains of *Lb. rhamnosus* into groups; (1) containing strain 50 was raffinose positive and (2) containing strains 23, 24 were raffinose negative.

The following characteristics sorbitol negative and cell-shaped indicated that strain 25 (resistant to 25µg/ml to vancomycin) do not belong to any of the above species of lactobacilli. Sugar fermentation pattern of this strain from it did not perfectly match coincided with the other lactobacilli in group II. Therefore, it was remain to be unidentified.

Identification by Whole Cell Protein Analysis: The results obtained by SDS-PAGE of whole-cell proteins discriminates as much as the DNA-DNA hybridization [29,30] and present a very good correlation between the results of numerical analysis of protein patterns and 16 rRNA based on oligonucleotide probe hybridization has been reported [14,31,32].

Our phenotypic identification is a little ambiguous. In order to resolve this problem and improve it, protein fingerprinting by SDS-PAGE method as complementary analysis to phenotypic characterization has been used. The analysis of cell protein extracts by SDS-PAGE of 14 representative strains was studied. It was undertaken by visual comparison of the electrophoretic patterns

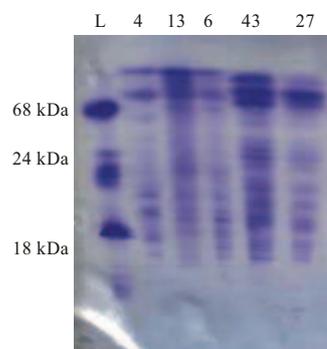


Fig. 1: Whole cell protein profiles of *Leuconostoc* (L4, 43, 27) and *Weissella*

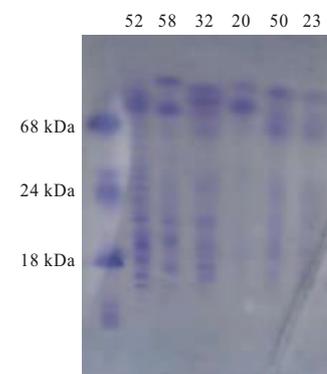


Fig. 2: Whole cell protein profiles of *Lactobacillus* (52, 58, 32, 50, 23) and *Enterococcus faecium* (20)

(Fig. 1, Fig. 2). That was done by the coefficients of similarity (>100) calculated by using the molecular weight of patterns in electrophoregrams. The coefficients of similarity (>100) were obtained for each two strains of the studied LAB (Table 3).

Sanchez *et al.* [13] have observed that the SDS-PAGE technique generated complex and stable patterns that were easy to interpret and compare with the reference strains of lactic acid bacteria. After numerical analysis of the resulting electrophoretic protein patterns the clusters

were discriminated with some exceptions and correlated well with different groups phenotypically found on Almagro Spain cheese.

Leuconostoc and Weissella paramesenteroides: The results of SDS-PAGE confirmed the assignment of strain 43 (isolated from goat milk, xyl⁻, mannit⁻, raff⁺) to *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* by coefficient of similarity of 78% (Table 3) with strain L₄ (ENSBANA-Dijon, xyl⁺, mannit⁺, raff⁻). This result clarifies the identity of the *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* strain 43. The slight dissimilarities between strains 43 and L₄ may be due to the different origin of the compared strains, as it was indicated by Samelis *et al.* [12]; Pérez *et al.* [33].

The two strains 6 (isolated from camel milk, ara⁻, xyl⁺, Celb⁺, raff⁻, mannit⁻) and 13 (isolated from cow milk, ara⁻, xyl⁻, Celb⁻, raff⁺, mannit⁻) have shown an 80.7% of similarity. That corroborated the assignment of them to the same identity, phenotypically defined as *Weissella paramesenteroides*.

Protein fingerprinting of strains 43 and 27 (isolated from the same goat milk sample) were very similar with a coefficient of 100%. Nevertheless, they were phenotypically identified as *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* for the first strain and *Weissella paramesenteroides* for the second. The same phenomenon has been found by Perez *et al.* [33]. The difficulty of the electrophoresis of cell-free extracts is to distinguish between the *Leuconostoc* subspecies which has been reported by Tsakalidou *et al.* [34] and Villani *et al.* [35] and it is probably because they are very close phylogenetic subspecies which produce very similar protein patterns [31,36]. These data and the sugar fermentation pattern indicated that it is quite possible to identify strain 27 as *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, which has lost dextran production and citrate utilisation. Several authors have mentioned this specificity in *Leuconostoc mesenteroides* [24,26].

The difference from two characters (arabinose, dextran) between strains 43 and 27 could not be demonstrated by the SDS-PAGE protein profile analysis, the same fact has been reported by Sanchez *et al.* [13].

The strain 27 and the strains 13 and 6, which were previously identified as *Weissella paramesenteroides*, had shown a low coefficient of similarity (Table 3). Hence, the protein profile revealed the atypical character of the strain 27.

The strain couples (L₄, 13), (L₄, 6), (43,13), (43,6), (27,13) and (27, 6) had given the following coefficients of

similarity 36, 48, 44.4, 48.6, 44.4 and 48.6%, respectively. These low level of similarity are in agreement with distant phylogenetic relationship between the genus of *Leuconostoc* sp. and *Weissella* [19].

Lactobacilli: The two strains 23 and 50 (respectively raff⁻ and raff⁺, isolated from the same sample of goat milk) have shown a high level of similarity with 85.2% (Table 3) and were defined as *Lb. rhamnosus*.

The strains 58, isolated from goat milk and 52, isolated from camel milk, except, the growth at 45°C for the first strain, they presented similar phenotypic profile. Strain 58 was previously identified as *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*. The coefficient of similarity 55.5% between the two strains, have shown different identity of them. Consequently, if strain 58 had previously identified as *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, the strain 52 had assigned as *Lb. plantarum* rather than *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*. On the other hand, the coefficient of similarity between strains 52 (isolated from camel milk, ara⁺, raff⁺) and 32 (isolated from roquefort cheese, ara⁻, raff⁻) was 77.8%. In regard to the level of similarity 52% between strains 58 and 32, the latter strain is closely related to 52 rather than 58 and could be named *Lb. plantarum*.

The low coefficients of similarity between strains 50 and 52, 50 and 58, 50 and 32, 23 and 52, 23 and 58, 23 and 32 (Table 3) are in agreement with the precedent propositions.

Therefore, protein electrophoresis SDS-PAGE had allowed the separation of strains possessing very high or similar phenotypic profiles. On the other hand, the possible mistake to the assignment of strain 52 to the genus *Lactobacillus* or *Lactococcus*, which can be caused by one's rod cell shaped (making the morphological determination difficult), had been excluded by the above result. The very low coefficients of similarity between *Lactobacillus* 25 and other *Lactobacillus* (Table 3) confirmed the phenotypic results, so, it is clearly that strain 25 is distant to the group of *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*.

Simova *et al.*, [37] described the clustering of kefir lactic acid bacteria strains by using amino acid profiles.

The SDS-PAGE technique generated complex and stable patterns that were easy to interpret and compare the profiles of the strains used in this study. After numerical analysis of the resulting electrophoretic protein pattern, the clusters were discriminated and correlated well with the different groups phenotypically found [13].

Homofermentative Cocci: The very low coefficient of similarity 17.9% (Table 3) between strains 38 and 20 indicated that strain 38 can not be identified as *Enterococcus faecium*.

The microscopic observation of strain 52 had shown the thickest rod-shaped cells, which is easy to be confused with cocci. If this strain was assigned to the genus *Lactococcus*, therefore, it could be identified phenotypically as *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis*. However, the low coefficient of similarity 29.6% between strains 52 and 21 showed that the previous proposition was not correct. The reason of this problem is that lactobacilli may produce very short or ellipsoid cells, under certain growth conditions. Pérez *et al.* [33] had indicated that the major problem encountered in the classical identification of LAB was the assignment to the genera *Lactococcus* or *Lactobacillus* which was based on the microscopic observation of the strains.

All strains occurring coccoid rod cells isolated from MRS supplemented with 25µg/ml of vancomycin were identified as *Leuconostoc* or *Weissella paramesenteroides*. *Weissella paramesenteroides* was dominante heterofermentative cocci in raw milk samples.

The biochemical and physiological tests are unsatisfactory for the identification of isolated LAB. The use of SDS-PAGE method had allowed the clarification of some ambiguous points in phenotypic identification, for example, it allowed the correction of the misidentification which is due to the presence of atypical characters, separation between strains which have closer phenotypic profiles, resolve the problem of microscopic determination of cell shape. Consequently, our results show that, protein fingerprinting analysis corroborate, complete and confirm the phenotypic identification. De Vuyst et Vancanneyt [38] shows that the isolation of novel taxa mainly depends on the cultivation approach used selective incubation media and conditions. The identification of isolated strains needs a polyphasic approach, including a combination of phenotypic and genotypic methods.

REFERENCES

1. De Palencia, P.F., M. Plaza, F. Amarita, T. Requena and C. Pelaez, 2006. Diversity of amino acid converting enzymes in wild lactic acid bacteria. *Enz. Microbial. Technol.*, 38: 88-93.
2. Badis, A., N. Laouabdia-Sellami, D. Guetarni, M. Kihal and R. Ouzrout, 2005. Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de Deux populations caprines locales Arrabia et Kabyle. *Sci. Technol.*, 23: 30-37.
3. Guessas and M. Kihal, 2004. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone: Raw goats' milk. *African J. Biotechnol.*, 3(6): 339-342.
4. Thapa, N., J. Pal and J.P. Tamang, 2006. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of eastern Himalayas. *Int. J. Food. Microbial.*, 107: 33-38.
5. Stiles, M.E., H. Wilhelm and W.H. Holzapfel, 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36: 1-29.
6. Axelsson, L., 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: S. Salminen, A. Von wright and M. Dekker (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 2nd edition, Inc., New York, pp: 1-72.
7. Badis, A., D. Guetarni, B. Moussa-Boudjemaa, D.E. Henni and M. Kihal, 2004b. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiol.*, 21: 579-588.
8. De Angelis, M., A. Corsetti, N. Tosti, J. Rossi, M.R. Corbo and M. Gobbetti, 2001. Characterization of non starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic and cell wall protein analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(5): 2011-2020.
9. Ogier, J.C., V. Lafarge, V. Girard, A. Rault, V. Maladen, A. Gruss, J.Y. Ieveau and A. Delacroix-Buchet A., 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(9): 5628-5643.
10. Catzeddu, P., E. Mura, E. Parents, M. Sanna and G.A. Farris, 2006. Molecular characterization of lactic acid bacteria from sourdough breads produced in Sardinia (Italy) and multivariate statistical analyses of results. *Syst. Appl. Microbiol.*, 29: 138-144.
11. Bensalah, F., M.J. Flores and A. Mouats, 2006. A rapid PCR based method to distinguish between *Enterococcus* species by using degenerate and species-specific *sodA* gene primers. *African J. Biotechnol.*, 5(9): 697-702.

12. Samelis, J., Tsakalidou, E., Metaxopoulos, J., Kalantzopoulos, G., 1995. Differentiation of *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus curvatus* isolated from naturally fermented Greek dry salami by SDS-PAGE of whole cell proteins. J. Appl. Bacteriol. 78, 157-163.
13. Sanchez, I., Sesena, S., Palop, L., 2003. Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplant by SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. Int. J. Food Microbiol., 2555: 181-189.
14. Sacilik S.C., Osmanagaoglo O., Gunduz U., Cokmus C., 2000. Availability of use of total extracellular proteins in SDS-PAGE for characterization of gram positive cocci. Turk. J. Biol. 24 : 817-823 .
15. Zamfir, M., M. Vancanneyt, L. Makras, F. Vaningelgem, K. Lefebvre, B. Pot, J. Swings and L. Vuyst, 2006. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. Syst. Appl. Microbiol., 29: 487-495.
16. Mathot, A.G., M. Kihal, H. Prevost and C. Diviès, 1994. Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar Media. Int. Dairy. J., 4: 459-469.
17. Kempler, G.M. and L.L. Mac Kay, 1980. Improved medium for detection of citrate fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Appl. Environ. Microbiol., 39 (4): 926-927.
18. Garvie, E.I., 1986b. Genus *Leuconostoc* Van Tieghem 1978. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt J.C. (Eds.), Bergey's Manual of systematic Bacteriology Vol 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp: 1071-1075.
19. Collins, M.D., J. Samelis, J. Metaxopoulos and S. Wallbanks, 1993. Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organism from fermented sausages: Description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of specie. J. Appl. Bacteriol., 75: 595-603.
20. Garvie, E.I., 1986a. Genus *Pediococcus* Claussen 1903. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.C. (Eds.), Bergey's Manual of systematic Bacteriology, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 1075-1079.
21. Farrow, J.A.E. and M.D. Collins, 1984. DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* et *Streptococcus salivarius*. J. Gen. Microbiol., 130: 357-362.
22. Schleifer, K.H. and R. Kilpper-Bälz, 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* NOM. rev. as *Enterococcus faecalis* Comb. nov and *Enterococcus faecium* Comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 34,;31-34.
23. Kersters, K., 1980. Polyacrylamide Gel electrophoresis of bacterial protein. In: Clement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. (Eds.), Methods in phytobacteriology. Akademia Kiado, Budapest, pp: 191-197.
24. Devoyod, J.J. and F. Poullain, 1988. Les leuconostocs propriétés: Leur rôle en technologie laitière. Le lait, 68 (3), 249-280.
25. Singh, S.K., S.U. Ahmed and A. Pandey, 2006. Metabolic engineering approaches for lactic acid production. Process. Biochem., 41: 991-1000.
26. Kihal, M., H. Prevost, M.E. Lhotte, D.Q. Huang and C. Diviès, 1996. Instability of plasmid encoded citrate permease in *Leuconostoc*. Lett. Appl. Microbiol., 22: 219-223.
27. Schleifer, K.H., J. Kraus, C. Dvorak, R. Kilpper-Bälz, M.D. Collins and W. Fischer, 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. Nov. System. Appl. Microbiol., 6: 183-195.
28. Carr, F.J., D. Chill and N. Maida, 2002. The lactic acid bacteria: A literature Survey. Cur. Rev. Microbiol., 28(4): 281-370.
29. Ferraz, P.N., C.C.P. Menezes, G.M. Danelli, J.O.P. Lizeu, E.R. Nasciemento and M.D. Lucchesi, 2000. protein profile analysis by SDS-PAGE of mycoplasma gallisepticum strains S6(208) and F-K810 growth in hayflick's and frey's media. Brazilian. J. Microbiol., 31(2): 11-17.
30. Priest, F.G., Austin, B., 1993. Modern bacterial taxonomy (2nd ed) Chapman and Hall, London.
31. Pot, B., C. Hertel, W. Ludwig, P. Descheemaeker, K. Kersters and K.H. Schleifer, 1993. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. Gasseri* and *L. Johnsoni*. Strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridisation. J. Gen. Microbiol., 139: 513-517.
32. Booyesen, C., L.M.T. Dicks, I. Meijering and A. Ackermann, 2002. Isolation, identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars. Int. J. Food Microbiol., 76: 63-73.

33. Pérez, G., E. Cardell and V. Zarate, 2000. Protein fingerprinting as a complementary analysis to classical phenotyping for the identification of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *Lait*, 80: 589-600.
34. Tsakalidou, E., E. Manolopoulou, E. Kabarak, E. Zoidou, B. Pot, K. Kersters and G. Kalantzopoulos, 1994. The combined use of whole-cell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.*, 17: 444-458.
35. Villani, F., G. Moschetti, G. Blaiotta and S. Coppola, 1997. Characterization of strains of *Leuconostoc mesenteroides* by analysis of soluble Whole-Cell protein pattern, DNA fingerprintings and restriction ribosomal DNA. *J. Appl. Microbiol.*, 82: 578-588.
36. Moschetti, G., G. Blaiotta, F. Villani and S. Coppola, S., 2000. Specific detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* with DNA primers identified by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 422-424.
37. Simova, E., Z. Simov, D. Beshkova, G. Frengova, Z. Dimitrov and Z. Spasov, 2006. Amino acid profiles of lactic acid bacteria, isolated from Kefir grains and kefir starter made from them. *Int. J. Food Microbiol.*, 107: 112-123.
38. De Vuyst, L. and M. Vancanneyt, 2006. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food. Microbiol.*, 24(2): 120-127.

Research Article

Technological Aptitude and Applications of *Leuconostoc mesenteroides* Bioactive Strains Isolated from Algerian Raw Camel Milk

Zineb Benmechernene,¹ Hanane Fatma Chentouf,¹ Bellil Yahia,¹ Ghazi Fatima,¹ Marcos Quintela-Baluja,² Pilar Calo-Mata,² and Jorge Barros-Velázquez²

¹Laboratory of Applied Microbiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Oran University, B.P. 16, Es-Senia, 31100 Oran, Algeria

²Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences/College of Biotechnology, University of Santiago de Compostela, Rúa Carballo Calero s/n, Campus Lugo, 27002 Lugo, Spain

Correspondence should be addressed to Zineb Benmechernene; b_zineb@hotmail.com

Received 14 June 2013; Revised 21 September 2013; Accepted 23 October 2013

Academic Editor: Denis Groleau

Copyright © 2013 Zineb Benmechernene et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Two strains (B7 and Z8) of the *Leuconostoc mesenteroides* subspecies *mesenteroides* that were isolated from Algerian camel milk from an initial pool of 13 strains and demonstrated a high ability to inhibit the growth of *Listeria* spp. were selected and characterised at the phenotypic and genotypic levels. Probiotic profiling and inhibition spectra against food borne pathogens in mixed cultures were also investigated. The bacteriocin produced by *L. mesenteroides* strain B7 was identified as leucocin B by specific PCR. *In vitro* studies demonstrated that both *Leuconostoc mesenteroides* strains exhibited a marked probiotic profile, showing high survival at low pH (2-3 and 4) in the presence of 0.5%, 1%, and 2% of bile salts and at pH 3 in the presence of 3 mg/mL pepsin. Susceptibility testing against antimicrobial agents was also performed for both strains. When tested in a mixed culture with *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, or *Staphylococcus aureus*, strain B7 reduced the numbers of these species by 1.87, 1.78, and 1.38 log units, respectively. Consequently, these two strains were found to possess good probiotic properties *in vitro* and a high capacity for *Listeria* spp. inhibition in mixed cultures. Therefore, these strains have a favourable technological aptitude and a potential application as novel probiotic starters.

1. Introduction

Camel milk has antimicrobial activity and a good conservation aptitude. Barbour et al. [1] reported that camel milk inhibits some pathogenic bacteria because of several protective proteins found in the milk, including lysozymes, lactoperoxidase, lactoferrin, immunoglobulin, and vitamin C. For these reasons, Yagil et al. [2] support that pasteurisation is not essential for camel milk if the camels are in good health. Camel milk composition is less stable than milk from other animals. These variations can be caused by many factors, such as geographical lactation, alimentary conditions, and the breed and age of the camel [3]. Lactic acid bacteria (LAB) from cow and goat milk have been well studied for both antimicrobial activity and bacteriocin production [4–6].

However, few studies have been conducted on the isolation and characterisation of LAB from camel milk [7–9] or on the antimicrobial activity [10–12].

Several LAB species produce a wide variety of antimicrobials that can be used for food preservation. In a number of instances, the inhibitory activity of LAB could be attributed to metabolic end products such as hydrogen peroxide, diacetyl and organic acids, and bacteriocin [13]. Currently, LAB include (13) different bacterial genera: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, and *Bifidobacterium*. These bacteria are used primarily as starters in fermented food products where they can develop certain organoleptic characteristics and increase the time of conservation [14–17].

LAB exhibit probiotic properties because these bacteria are normal flora in gastrointestinal tract [18] and have no harmful effects [19]. Moreover, the addition of antagonistic bacterial preparations as protective cultures is another approach for biopreservation [20]. In addition, possible microbial interactions, either beneficial (cooperation) or unfavourable (inhibition), can be achieved in mixed strain cultures. These mixed cultures are commonly used as starter cultures in dairy manufacturing because of the acid production, growth rate, proteolytic activity, bacteriocin production and sensitivity, aroma production, and phage sensitivity of these cultures [21]. However, these technologies can be limiting for commercial application because of the negative impacts or the low reproducibility percentage of the response [22]. For these reasons, the characterisation of LAB as probiotic cultures should respond to several criteria, such as the ability to survive the specific conditions of the gastrointestinal tract, including low pH, proteolytic enzymes, and bile salt concentrations [23].

Because these bacteria are meant to be used as protective cultures, the inhibition pattern, safety, and functional and technological properties of these bacteria should also be examined.

Few studies have reported the high potential of using *Leuconostoc* as a probiotic strain. Kekkonen et al. [24] showed that the use of *Leuconostoc* as probiotic strain in inducing cytokines was better than that of the probiotic *Lactobacillus* strain that is presently in clinical use. In addition, Allameh et al. [18] reported for the first time the use of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from the intestine of snakehead fish as a potentially new probiotic for aquaculture systems for the development of fish production. Moreover, *Leuconostoc lactis* has been shown to have a potential for use as a single starter culture in Khanon-jeen production and could reduce the microbial risk and fermentation processing time [25]. Additionally, *Leuconostoc* strains have potential as protective cultures for vacuum packed meat products [26], and the bacteriocins of *Leuconostoc* can be used as protective agents in combination with another starter culture in fermented meat [27]. However, the use of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from camel milk as either a probiotic strain or a protective culture has never been reported. Therefore, we isolated and identified *Leuconostoc* strains from camel milk as new probiotic or protective cultures for the first time.

2. Materials and Methods

2.1. Raw Camel Milk Sampling. Thirteen *Leuconostoc* strains were isolated from four different camel milk samples, which were collected from two different Saharan areas (Nâama and Béchar) in South Western Algeria. The first two samples were collected from two camels (*Camelus dromados*) in Nâama that differed in age (10 and 15 years old) and colour (grey and black) but had the same lactation period (March, 2011). The diet of the camels was based on natural Saharan plants, such as Drinn (*Arstide pungens*). Samples from Béchar were collected from brown camels aged less than 10 years in the arid Abadla region in the period 2009–2011. Sampling was performed under aseptic conditions by washing the teats with

warm water containing 2% bleach and collecting the milk in sterile bottles after hand washing with diluted alcohol. Samples were maintained at 4°C and were transported in iceboxes to the laboratory for analysis.

2.2. *Leuconostoc* Isolation. The bioactive *Leuconostoc* considered in this work were isolated from the raw camel milk as described above. All strains were stored at –80°C and were maintained in reconstituted skimmed milk containing 30% (w/v) glycerol. All strains were cultured in MRS broth (Liofilchem, Teramo, Italy) at 30°C for 24 h and were then seeded onto MRS agar (Liofilchem) to obtain single colonies. The wild type and reference *Leuconostoc* strains used in this study belonged to the collection of our laboratory.

Based on the results obtained from the inhibitory assays, two bioactive *leuconostocs* strains (B7 and Z8) were selected and subjected to phenotypic and morphological characterisation based on the following criteria: CO₂ production, growth at different temperatures (4°C, 15°C, 30°C, 37°C, and 45°C), growth at different pH (4.8 and 6.8), and growth at different NaCl concentrations (3% and 6.5%). Additionally, all strains were subjected to the following biochemical tests to differentiate between *Leuconostoc* and *lactobacilli*: dextran production on MSE medium [28], arginine hydrolysis on M16BCP medium (Oxoid Ltd., London, UK), and citric acid degradation on Kempler and McKay solid medium. Carbohydrate fermentation was tested on MRS supplemented with bromocresol purple as a pH indicator using the following sugars to differentiate the subspecies of *Leuconostocs*: arabinose, maltose, rhamnose, esculin, manitol, sorbitol, galactose, lactose, fructose, glucose, sucrose, and xylose. All strains were phenotypically identified as belonging to the *Leuconostoc* genus based on the following criteria: ovoid shape, Gram-positivity, catalase negativity, vancomycin-resistance, production of gas from glucose, lack of arginine hydrolysis, and fermentation profiles.

2.3. Genetic Identification of Bioactive *Leuconostoc* Strains. A fragment of the 16S rRNA gene of the two bioactive strains was amplified by PCR using the universal primer pair p8FPL (forward: 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and p806R (reverse: 5'-GGACTACCGGGTATCTAAT-3') [29]. The assays comprised 100 ng of template DNA, 25 µL of a master mix (BioMix, Bioline, London, UK) (this included the reaction buffer, dNTPs, and magnesium chloride), Taq DNA polymerase, 25 pmol of each oligonucleotide primer, and double-distilled water to achieve a final volume of 50 µL. Amplification conditions were as follows: denaturing at 94°C for 7 min., 35 cycles of denaturation (94°C for 60 sec.), annealing (55°C for 60 sec.), extension (72°C for 60 sec.), and a final extension at 72°C for 15 min. The PCR was performed as described by Böhme et al. [30].

The two PCR products were then sequenced using the same primers used for PCR. The sequences were analysed with Chromas software (Griffith University, Queensland, Australia) and aligned using Clustal-X software [31, 32]. Following alignment, these sequences were identified by searching for sequence homology among published reference sequences using the web BLAST tool (National Center for

Biotechnology Information (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) [33]. Homologies higher than 99% with respect to a strain type were considered acceptable identifications.

2.4. Genetic Identification of Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides* Strains. The bacteriocins produced by *L. mesenteroides* strains were identified by PCR using the primers described by Xiraphi et al. [34]. The detection of the following bacteriocins: mesenterocin B, mesenterocin Y, leucococin A, leucococin B, and leucocin A-TAF was carried out using the following primers: mesB, mesY, lcnA, lcnB, and lcnA-TAF, respectively. The reaction conditions were as described by Xiraphi et al. [34]. The nucleotide sequencing of the bacteriocin gene was performed as described above.

2.5. Probiotic Evaluation of Bioactive *L. mesenteroides* Strains

2.5.1. Inhibition Spectra of *L. mesenteroides* Strains against Indicator Microorganisms. Preliminarily, all strains were tested for the ability to produce antimicrobial substances using the direct method described by Fleming et al. [35]. Inhibitory activity was investigated using the following indicator bacteria: *Staphylococcus aureus*: 43300 (Centre Hospitalier Universitaire, C.H.U Oran, Algeria), *Listeria innocua* (ATCC 33090), and *Listeria ivanovii* (ATCC 19119).

Alliquots of 80 μL from 18 h cultures of 10^7 CFU mL^{-1} *Leuconostoc* strains were spotted onto MRS agar using multipoint inoculators and were incubated at 30°C for 24 h [36]. Following the incubation, a semisolid Mueller Hinton (Oxoid) medium containing 100 μL of 10^7 CFU mL^{-1} of the indicator culture was poured as an overlay. All plates were then incubated at 37°C for 24 h and examined for inhibition zone formation. Inhibition was considered positive when the width of the clear inhibition halos was ≥ 0.5 cm.

2.5.2. Detection of the Proteinaceous Nature of the Inhibitory Agent. The proteinaceous nature of the inhibitory substance was detected using an indirect method. In this method, a *Leuconostoc* strain was incubated for 18 h in MRS broth at 30°C and was then centrifuged at 8,000 rpm for 10 minutes. Then, 100 μL of the supernatant (FCS) was inoculated on wells formed on solid MRS medium that were seeded by indicator strains, and the wells were incubated for 24 h to 48 h at 37°C. Colonies surrounded by a clear zone with a diameter greater than 2 mm in the layer of the indicator culture were considered positive. Several factors were eliminated to confirm the proteinaceous nature of the inhibitory substance, such as lactic acid using a buffered medium and the elimination of the effect of hydrogen peroxide by using indicator strains with catalase enzyme such as *S. aureus*, *Listeria innocua*, and *L. ivanovii*. In addition, proteolytic enzymes (trypsin-chymotrypsin) and heat treatments of the supernatant at different temperatures (75°C, 80°C, and 100°C) were used to identify the proteinaceous nature of the inhibitory substance.

2.5.3. pH Tolerance. Bacterial cells from overnight MRS cultures were collected by centrifugation and were washed with sterile phosphate buffer saline, pH 8. Centrifugation and washing procedures were repeated three times. The bacterial

cells were resuspended in sterile PBS adjusted to pH 2, 3, or 4 and were incubated at 37°C for 3 h. The viable bacterial counts were then determined in MRS agar.

2.5.4. Bile Salt Tolerance and Bile Salt Hydrolyses. Bacterial cells from overnight MRS cultures were harvested by centrifugation, washed, and resuspended in PBS (pH 8) supplemented with 0.5%, 1.0%, or 2.0% (w/v) oxgall (Oxoid Ltd., England). Viable cell counts were determined in MRS agar after 4 h at 37°C.

For the bile salt hydrolysis assay, overnight bacterial cultures of each *L. mesenteroides* strain were streaked on MRS agar, supplemented with 0.5% (w/v) oxgall, and incubated for 24 and 48 h at 37°C. The bacterial hydrolysis of the bile salt was visualised as altered colony morphology compared with the control MRS plates.

2.5.5. Resistance to Pepsin. Bacterial cells from overnight MRS cultures were collected, washed, and resuspended in PBS buffer (pH 2 and 3) supplemented with 3 mg/mL of pepsin. The resistance of the *L. mesenteroides* strains was determined by counting the initial viable cells in MRS agar after 3 h incubation at 37°C.

2.5.6. Haemolytic Activity. An overnight culture of the *L. mesenteroides* strains was streaked in triplicates on Columbia agar plates containing 5% (w/v) human blood and incubated for 48 h at 30°C. Blood agar plates were examined for signs of β -haemolysis (clear zones around colonies), α -haemolysis (green zones around colonies), and γ -haemolysis (no zones around colonies).

2.5.7. Antibiotic Sensitivity Test. The antibiotic susceptibility of the two strains of *L. mesenteroides* (B7 and Z8) was tested three times against 13 antibiotics using Bio-Rad discs (6 mm). *L. mesenteroides* strains were cultured in MRS broth at 30°C for 18 h and were then adjusted to a 0.5 McFarland scale and smeared homogeneously on MRS culture plate. Antibiotic discs were placed on the plates and incubated for 24 h at 37°C. The antibiotics included gentamycin (GM, 10 μg), streptomycin (S, 10 μg), amoxicillin (AMX, 25 μg), tetracycline (TE, 30 μg), chloramphenicol (C, 30 μg), ampicillin (AM, 10 μg), erythromycin (E, 15 μg), cephalotin (CEF, 30 μg), lincomycin (L, 15 μg), Neomycin (N, 30 μg), kanamycin (K, 30 μg), penicillin (P, 6 μg), and vancomycin (VA, 30 μg).

The inhibitory circles emerging after 24 h of incubation were measured. Activity was assessed as sensitive (≤ 21 mm), intermediate (16–20 mm), and resistant (≥ 15 mm), as previously described by Liasi et al. [37].

2.6. Acidity and Growth Kinetics in Pure and Mixed Cultures. To study the growth kinetics of *L. mesenteroides* in pure cultures and cultures mixed with pathogens strains (*L. innocua*, *L. ivanovii*, and *S. aureus*), strain B7 was selected and inoculated by streaking on solid MRS medium and incubated at 30°C for 18 h. After incubation, a colony was inoculated into MRS liquid and was incubated at 30°C for 18 hours. Then, 100 mL of the 18 h culture was inoculated into 10 mL of

skimmed milk containing 0.3% yeast extract and was incubated at 30°C for 18 h [38].

The bacterial population measurement with the indicator strains in pure and mixed cultures was performed by counting in Nutrient Agar medium (Oxoid) to differentiate between the colonies of *Leuconostoc* and *Listeria* spp. where latter appear larger, the Baird Parker medium (Oxoid) to count *S. aureus* and MRS to count the *Leuconostoc* strain.

Strain B7, which is the most efficient producer of antimicrobial substances, and three indicator strains, that is, *L. innocua* ATCC 33090, *L. ivanovii* ATCC 19119 and *S. aureus* ATCC 43300, were routinely subcultured in 10 mL of skim milk with 0.3% yeast extract (Oxoid) that had an initial concentration of 10^7 CFU/mL for *L. innocua* ATCC 33090, 10^7 CFU/mL for *L. ivanovii* ATCC 19119, and 10^7 UFC/mL for *S. aureus* 43300. The three strains were inoculated separately into 100 mL of skim milk for monitoring pure cultures, and the mixed culture was prepared by mixing a culture of the indicator strains with the test strain B7 at a concentration of 10^7 CFU. The cultures were divided into tubes and incubated at 30°C for 24 h. Every three hours, the samples were aseptically withdrawn from tubes to determine the pH, titrable acidity, and the growth rate. This experiment was repeated three times [4].

2.7. Statistical Analysis. Several statistical models have been proposed to estimate growth parameters from the curves obtained by the counting methods. An ANOVA and range tests were used to evaluate the difference between the average of pH, acidity, and bacterial load and were represented by log *N* and μ max. The significance of the variation in the results of the antimicrobial activity was evaluated by two factors: repeatability and reproducibility [39, 40].

3. Results

3.1. Isolation, Selection, and Identification of *Leuconostoc* Isolates from Raw Camel Milk. A total of thirteen *Leuconostoc* strains were isolated from camel milk. The isolates exhibited ovoid shape and were associated in short pairs and/or chains. All isolates were Gram-positive, catalase negative, citrate positive, able to produce CO₂ from glucose, able to produce dextran from sucrose, and unable to hydrolyse arginine. According to the antibacterial test, B7 and Z8 showed more inhibition zones than the other strains. Therefore, these two strains were selected for probiotic profiling and behavioural studies in the presence of food borne pathogens. The results obtained from physiological fermentation profiling (Table 1) and 16 srRNA as a molecular technique (data not shown) identified B7 and Z8 as *L. mesenteroides* and revealed 99% homology with other sequences from the reference strains deposited in the GenBank, according to the BLAST tool.

3.2. Genetic Identification of the Bacteriocin. Specific primers for mesenterocin Y, mesB and Leucocin A, LcnB, and LcnA-TAF were tested on the extracted DNA. As shown in Figure 1, the specific primer for leucocin B produced a faint PCR product of the expected molecular weight. Sequencing and alignment with respect to sequences deposited in



FIGURE 1: The amplification of bacteriocins produced by *Leuconostoc mesenteroides* B7 strain with LcnB primers; lane M, MW marker; lane 2, *Leuconostoc mesenteroides* B7B; lane 5, *Leuconostoc mesenteroides* B7'B; and lane 8, *Leuconostoc mesenteroides* RB.

GenBank database confirmed matching with respect to a bacteriocin (mesY, mesC, mesD, mesE, mesF, mesH, and mesB) from *L. mesenteroides* (data not shown).

3.3. Antimicrobial Activity of *Leuconostoc* Isolates. B7 and Z8 strains exhibited inhibitory activity against several pathogenic bacteria, including *S. aureus*: 43300, *L. innocua* (ATCC 33090), and *L. ivanovii* (ATCC 19119). The inhibition zones were measured, and the results indicated that the inhibition intensity and range varied depending on the *Leuconostoc* species assayed (Figure 2). Furthermore, to investigate whether the cause of the inhibition was due to the protein substance, buffered supernatants adjusted to pH 6.8 were treated with proteolytic enzymes, which led to the disappearance of the inhibition zones (Figure 2). This result indicated that inhibition was caused by a proteinaceous compound.

However, inhibition remained after heating the bacterial supernatants to a temperature of 100°C (data not shown), which indicated that the causative inhibitory agent is heat resistant. These results agree with previously reported results [41–45].

3.4. pH Tolerance. The viable cell counts of the two *L. mesenteroides* strains after a 3 h exposure to low pH are shown in Table 2. Strain B7 was viable at all pH levels. The results showed a decrease of 21.17% at pH 2 but increases of 0.49% and 5.06% at pH 3 and 4, respectively. The *L. mesenteroides* strain Z8 was not viable at pH 2, but marked increases of 7.49% and 2.43% were observed at pH 3 and 4, respectively. The highest viability was observed at pH 4.

3.5. Bile Salt Tolerance and Bile Salt Hydrolysis. The results of bile salt tolerance assay are shown in Table 3. The two *L. mesenteroides* strains were able to grow in the presence of 0.5%, 1%, and 2% oxgall. The reduction ranges after a 4 h exposure were 18.21%–21.27% and 1.92%–13.53% for strains B7 and Z8, respectively. The highest resistance was observed

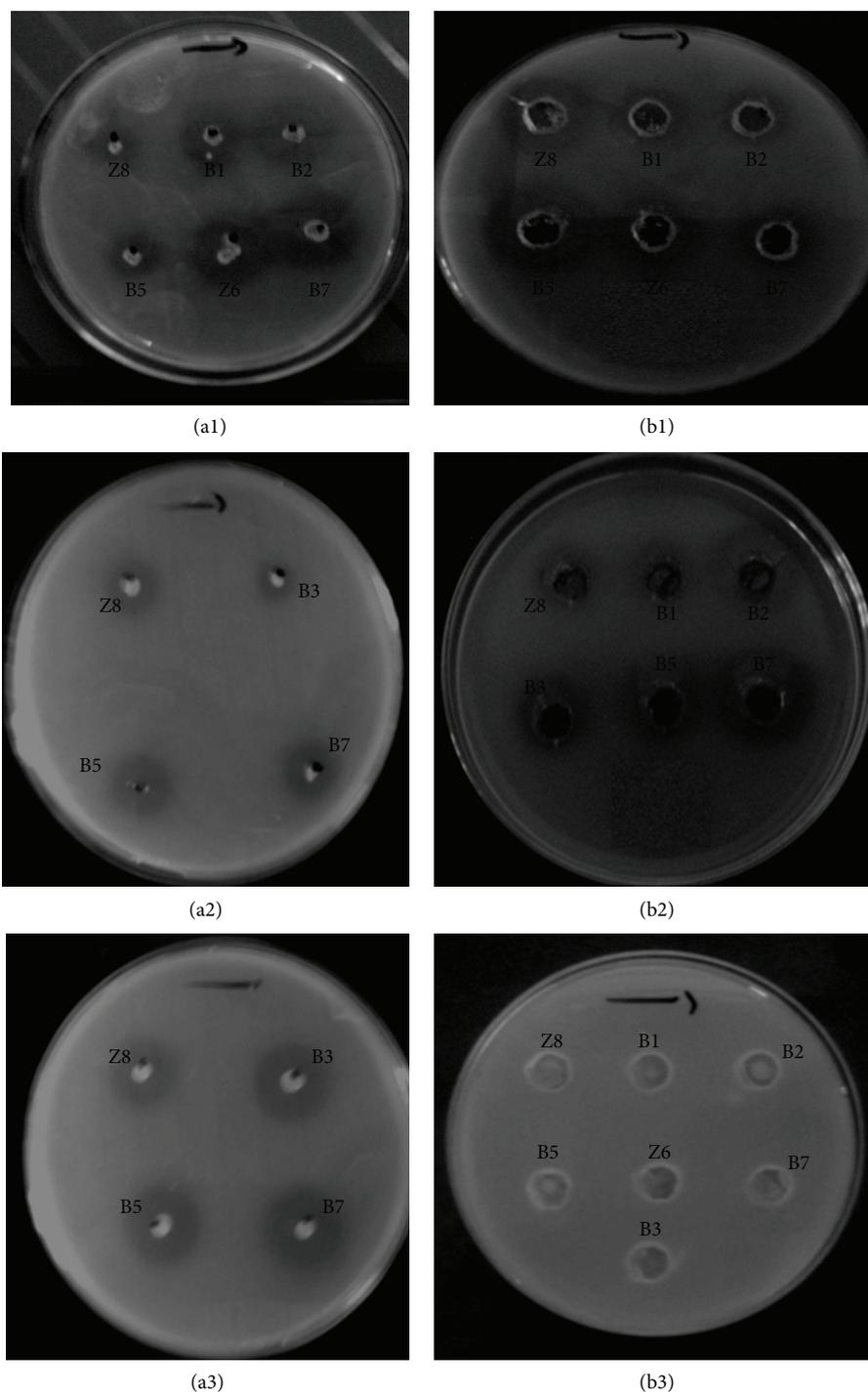


FIGURE 2: The inhibition spectra of *Leuconostoc mesenteroides* strains against indicator microorganisms; B1, B2, B5, B7, and B3: *Leuconostoc mesenteroides* isolated from camel milk sample 1; Z6 and Z8: *Leuconostoc mesenteroides* isolated from camel milk sample 2. (a1) Inhibition of *Listeria innocua* (ATCC 33090) by *Leuconostoc mesenteroides* using a direct method. (a2) Inhibition of *Listeria ivanovii* (ATCC 19119) by *Leuconostoc mesenteroides* using a direct method. (a3) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Leuconostoc mesenteroides* using a direct method. (b1) Antibacterial activity of *Leuconostoc mesenteroides* versus *Listeria innocua* (ATCC 33090) using a buffered medium. (b2) Antibacterial activity of *Leuconostoc mesenteroides* versus *Listeria ivanovii* (ATCC 19119) using a buffered medium. (b3) Antibacterial activity of *Leuconostoc mesenteroides* versus *Listeria ivanovii* (ATCC 19119) using a buffered medium treated by chymotrypsin.

TABLE 1: Physiological tests and fermentation profiling of bioactive *Leuconostoc* strains isolated from camel milk.

Strains	Catalase	Growth in the presence of NaCl		pH		Growth at					Fermentation profile											
		3%	6.5%	4.8	6.8	4°C	15°C	30°C	37°C	45°C	Arabinose	Maltose	Rhamnose	Esculin	Manitol	Sorbitol	Galactose	Lactose	Fructose	Glucose	Sucrose	Xylose
Z8	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
B7	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-

TABLE 2: The effect of low pH on the viability of *Leuconostoc mesenteroides* strains.

	pH2		pH3		pH4	
	0 h	3 h	0 h	3 h	0 h	3 h
Ln. B7	8.36 ± 0.29	6.59	8.16	8.20	8.29 ± 0.14	7.87
Ln. Z8	7.99	0	8.14 ± 0.007	8.75 ± 0.007	8.62 ± 0.007	8.83 ± 0.007

All results are expressed as log CFU/mL. Values in the same row followed by a different letter are significantly different ($P < 0.05$).

Ln. B7 refer to *Leuconostoc mesenteroides* B7.

Ln. Z8 refer to *Leuconostoc mesenteroides* Z8.

TABLE 3: The effect of oxgall concentration on the viability of *Leuconostoc mesenteroides* strains.

	0.5%		1%		2%	
	0 h	4 h	0 h	4 h	0 h	4 h
Ln. B7	8.45 ± 0.007	6.86 ± 0.14	8.65 ± 0.19	6.81 ± 0.18	8.15 ± 0.007	6.66
Ln. Z8	8.35 ± 0.056	7.22 ± 0.16	8.30 ± 0.056	7.92 ± 0.056	8.33 ± 0.007	8.17 ± 0.23

All results are expressed as log CFU/mL. Values in the same row followed by a different letter are significantly different ($P < 0.05$).

Ln. B7 refer to *Leuconostoc mesenteroides* B7.

Ln. Z8 refer to *Leuconostoc mesenteroides* Z8.

TABLE 4: The effect of pepsin on the viability of *Leuconostoc mesenteroides* strains.

	Pepsin (pH2)		Pepsin (pH3)	
	0 h	3 h	0 h	3 h
Ln. B7	7.18	0	7.71	7.51
Ln. Z8	8.81	0	8.72 ± 0.071	8.25

All results are expressed as log CFU/mL. Values in the same row followed by a different letter are significantly different ($P < 0.05$).

Ln. B7 refer to *Leuconostoc mesenteroides* B7.

Ln. Z8 refer to *Leuconostoc mesenteroides* Z8.

in B7. Neither *L. mesenteroides* strain was able to hydrolyse bile salt.

3.6. Resistance to Pepsin. Neither strain was able to survive at pH 2 when 3 mg/mL of pepsin was added. However, a remarkable resistance was observed at pH 3 when 3 mg/mL of pepsin was added. Strain B7 decreased by 2.6%, and strain Z8 decreased by 5.4%. The results are shown in Table 4.

3.7. Haemolytic Activity. Neither of the *Leuconostoc mesenteroides* strains was able to hydrolyse human blood, indicating that these strains are nonhaemolytic bacteria.

3.8. Antibiotic Sensitivity Test. The diameters of the inhibition zones (in mm) of the antibiotic tested against *L. mesenteroides* strains are shown in Table 5. The two strains were resistant to kanamycin, streptomycin, tetracycline, and vancomycin and were sensitive to amoxicillin, ampicillin, cephalotin, chloramphenicol, erythromycin, lincomycin, and penicillin. A moderate resistance was observed against gentamycin and neomycin.

3.9. Kinetic Monitoring of pH Evolution and Acidity. The evolution of pH in pure and mixed cultures can be observed in Figures 3 and 4. A significant pH decrease was observed in the mixed cultures after 72 h for the three indicator strains. Thus, *L. innocua*, *L. ivanovii*, and *S. aureus* pure cultures were

less acidifying in milk medium as compared to the mixed cultures. Accordingly, significant pH decreases from 6.41 ± 0.01 to 3.73 ± 0.24 for *L. innocua*, from 6.27 ± 0.03 to 3.87 ± 0 for *L. ivanovii*, and from 6.37 ± 0.00 to 3.84 ± 0.03 for *S. aureus* were determined.

3.10. The Growth Kinetics of Pathogenic Indicator Strains Pure Cultures and Cultures Mixed with a *Leuconostoc* Strain. The maximum growth rate " μ_{max} " was estimated using the model described by Baranyi and Roberts [39]. Significant reductions of the listerial load after the addition of the B7 protective culture were observed, as shown by a regression in the G time. The largest bacterial regression was attributed to *Listeria innocua* ATCC 33090 (Figure 5). A lower decrease in the staphylococcal load was also observed after the addition of strain B7.

The maximum growth rate (μ_{max}) of the control *L. innocua* ATCC 33090 culture was 0.243. The μ_{max} in the presence of strain B7 was 0.148, which is a growth delay of 109.2 min compared to the control (Figure 5). *Listeria ivanovii* ATCC 19119 exhibited a μ_{max} of 0.219 in pure culture and 0.168 in mixed culture, which is a growth delay of 57.6 min. The μ_{max} of *S. aureus* ATCC 43300 was 0.338 for the control and 0.293 in the presence of strain B7 with a growth delay of 31 min.

Following the study of the growth kinetics, culture B7 showed relatively a slow growth. Bioprotective strains promoted their own growth to control pathogens by inhibiting pathogenic growth. The reductions in the listerial loads were approximately 1.87 and 1.78 log units for *L. innocua* and *L. ivanovii*, respectively. A reduction of approximately 1.38 log units was observed for *S. aureus*, which was a smaller reduction than those observed for *Listeria* strains.

4. Discussion

Two *Leuconostoc* strains (B7 and Z8) isolated from camel milk were characterised by their genetic profile, probiotic profile,

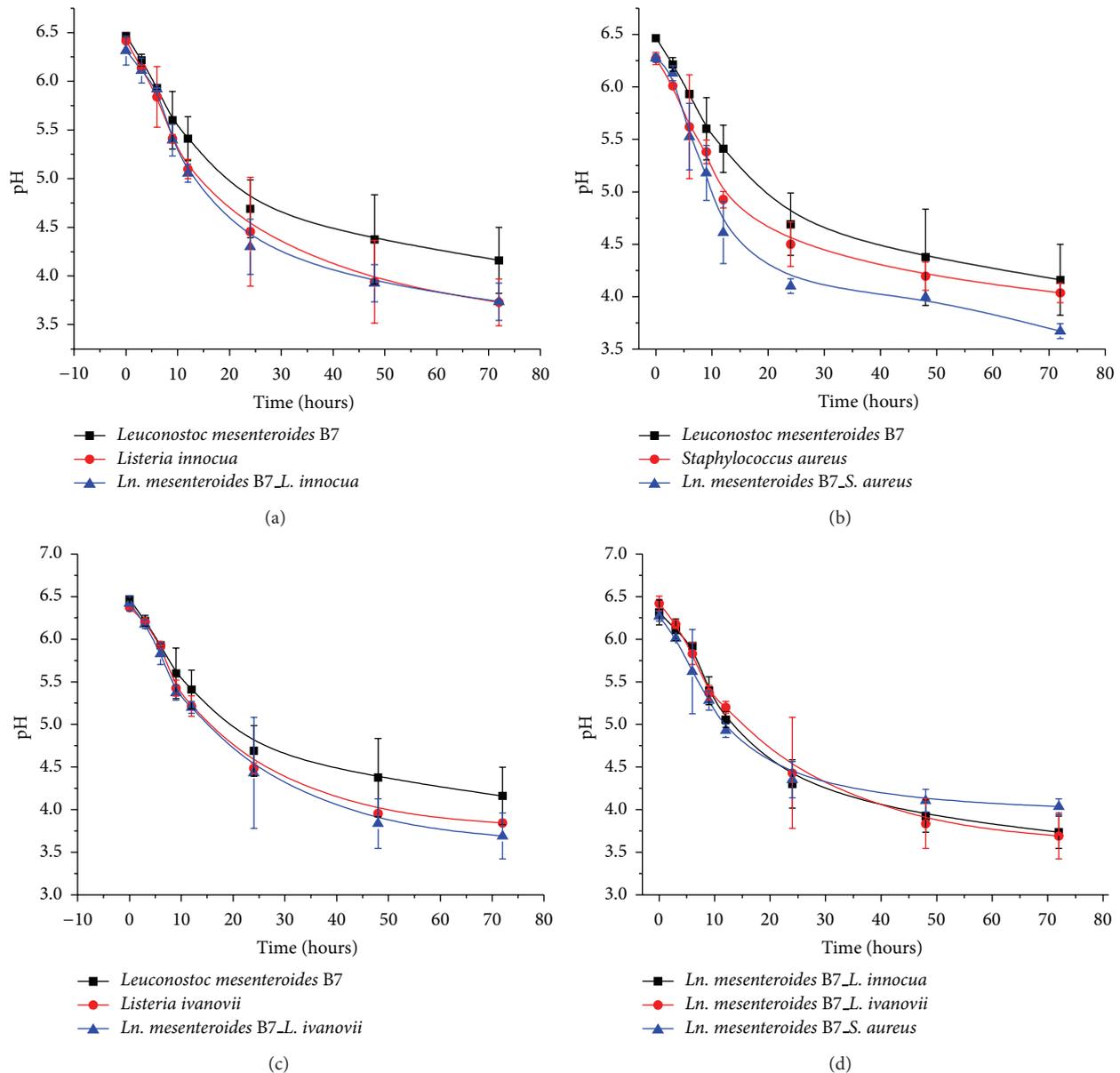


FIGURE 3: Monitoring the pH of pure and mixed cultures of B7 strain and indicator pathogens. (a) pH variation of *Leuconostoc mesenteroides* B7 and *Listeria innocua* strains in both pure and mixed cultures. (b) pH variation of *Leuconostoc mesenteroides* B7 and *Staphylococcus aureus* strains in both pure and mixed cultures. (c) pH variation of *Leuconostoc mesenteroides* B7 and *Listeria ivanovii* strains in both pure and mixed cultures. (d) pH variation comparison of *Leuconostoc mesenteroides* B7, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria ivanovii* strains in mixed culture.

and behaviour against food-borne pathogens in mixed culture. The antimicrobial activities exhibited by these strains were sensitive to proteolytic enzymes but were heat stable; therefore, the antimicrobial activity may be due to heat-stable protein or peptides.

In the present study, the genes responsible for the production of bacteriocin were detected using LcnB primers. Interestingly, *L. mesenteroides* B7 showed the expected molecular weight for a leucocin B, suggesting that these strains should be examined on the genetic and functional levels. The molecular characterisation by the 16s rRNA gene was in agreement with the phenotypic characterisation. The strains exhibited high

similarity among themselves and with sequences from the reference strains in GenBank.

Probiotic foods should maintain the viability of the probiotic bacteria during the preparation and shelf life of the products and during the transit through the gastrointestinal tract to exert their beneficial effects [44]. Selecting potential probiotic strains that can effectively perform in the gastrointestinal (GI) tract is a significant challenge [45]. Therefore, we characterised the probiotic profiles of two strains of *L. mesenteroides* (B7 and Z8). Acid and bile tolerance were two fundamental properties that indicate the ability of these microorganisms to survive through the host GI tract [46].

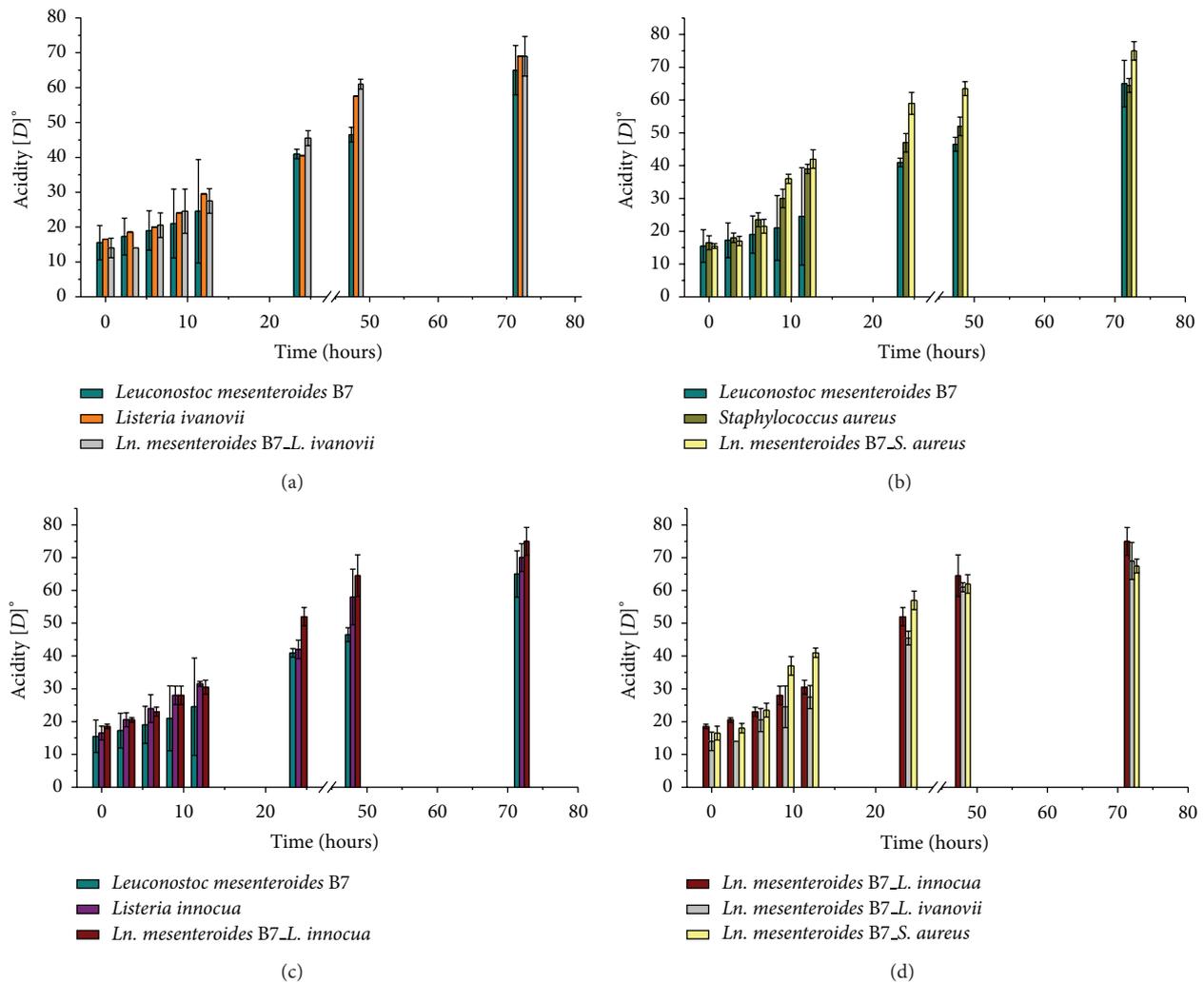


FIGURE 4: The acidity kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* B7 strain and indicator pathogens in pure and mixed cultures. (a) Acidity variation expressed in dornic degree for *Leuconostoc mesenteroides* B7 and *Listeria ivanovii* in both pure and mixed cultures. (b) Acidity variation expressed in dornic degree for *Leuconostoc mesenteroides* B7 and *Staphylococcus aureus* in both pure and mixed cultures. (c) Acidity variation expressed in dornic degree for *Leuconostoc mesenteroides* B7 and *Listeria innocua* in both pure and mixed cultures. (d) Comparison of acidity variation expressed in dornic degree for *Leuconostoc mesenteroides* B7 *Listeria ivanovii*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria innocua*, respectively, in mixed culture.

Argyri et al. [47] found no resistance to low pH for 16 *L. mesenteroides* strains from a total of 17. One strain was able to resist exposure to pH 2.5, but the viable counts of most strains were less than 1 log CFU/mL after 3 h. Our results showed a good viability for the two *L. mesenteroides* when exposed to the acidic condition of the stomach (pH 3 and 4). The viable count of strain B7 in pH 2 was 6.59 log CFU/mL, but strain Z8 showed no viability.

The presence of bile salt in the small intestine is another challenge for probiotic bacteria. The two *L. mesenteroides* strains survived well in the presence of different concentrations of bile salt (0.5, 1, and 2% (w/v)), with some loss in viability. A recent study showed that bile salt affected the growth rate and ability of isolated *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* [18]. Surono [48] found that *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* IS-27526 had a poor survival rate of 4.37 log CFU/mL in the presence of 0.3% oxgall (w/v). Allameh

et al. [18] showed the tolerance of *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* after 2, 4, and 8 h incubation periods in presence of 0.0, 0.15, and 0.3% of bile salt, respectively. The results of this study showed not only viability but also proliferation in all three concentrations for all incubation periods.

A probiotic needs to survive conditions such as low pH, pepsin, and pancreatin activity and bile while adhering to epithelial cells and competitively excluding pathogens [49]. In our study, *L. mesenteroides* strain B7 was viable at pH 2, but neither strain showed viability at pH 2 when 3 mg/mL of pepsin was added. However, both strains were viable at pH 3 and 4 with pepsin supplementation. A similar study by Seo et al. [50] showed that *L. mesenteroides* YML003 exhibited a higher survival of $1.7 \cdot 10^5$ CFU/mL after exposure to artificial gastric juices, with an initial cell number of $2.5 \cdot 10^8$ CFU/mL.

The absence of haemolytic activity and antibiotic resistance are considered safety prerequisites for the selection of

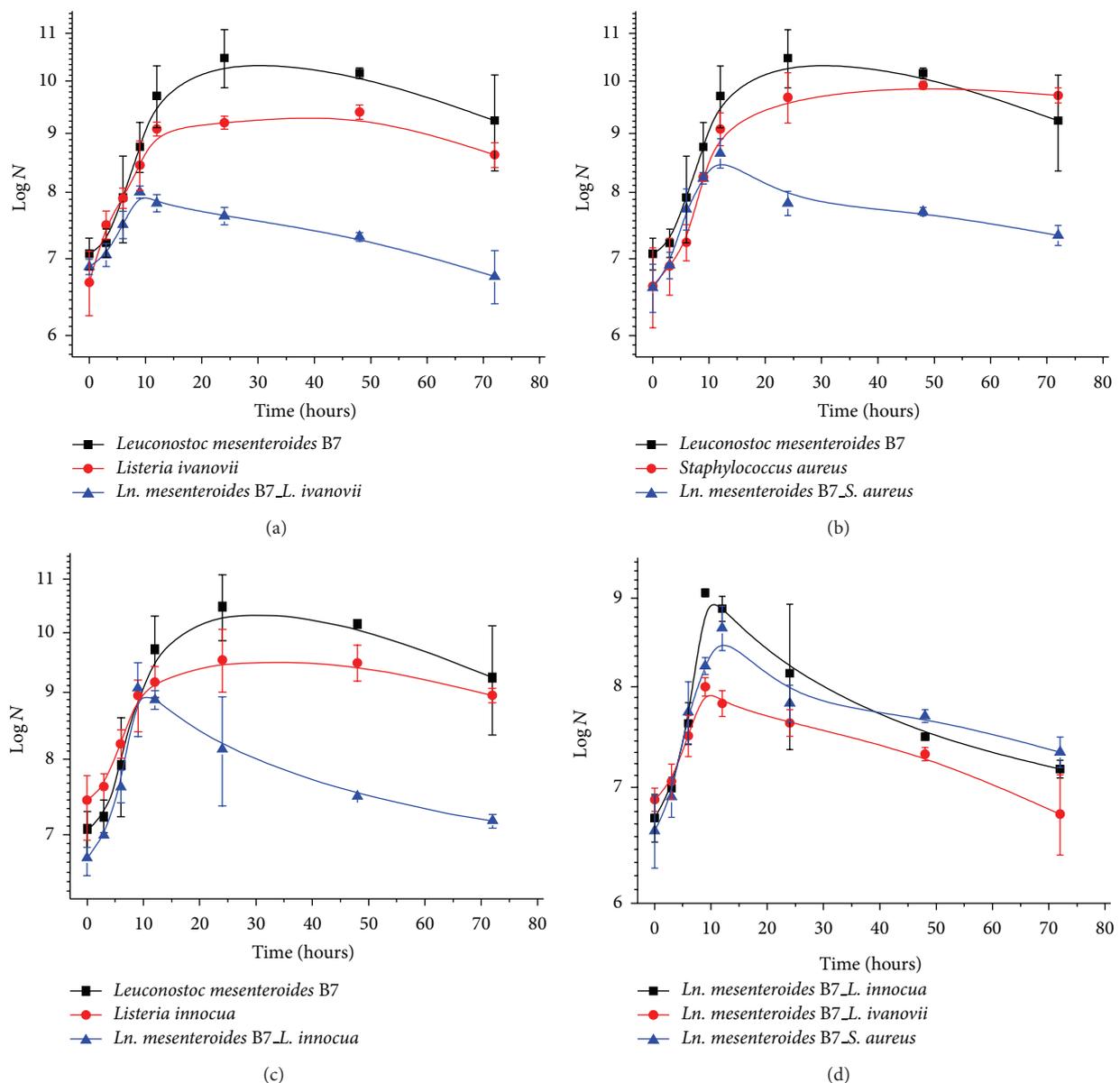


FIGURE 5: The growth kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* B7 strain and indicator pathogens in pure and mixed cultures. (a) Graphical representation of the growth kinetics expressed in log N of *Leuconostoc mesenteroides* B7 and *Listeria ivanovii* in pure and mixed cultures. (b) Graphical representation of the growth kinetics expressed in log N of *Leuconostoc mesenteroides* B7 and *Staphylococcus aureus* in pure and mixed cultures. (c) Graphical representation of the growth kinetics expressed in log N of *Leuconostoc mesenteroides* B7 and *Listeria innocua* in pure and mixed cultures. (d) Graphical representation of the growth kinetics expressed in log N of *Leuconostoc mesenteroides* B7, *Listeria ivanovii*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria innocua*, respectively, in mixed culture.

a probiotic strain [51]. No zones were detected around the colonies of the two *L. mesenteroides* strains when grown in Columbia human blood agar, suggesting that there was no γ -haemolytic activity *in vitro*. The lack of γ -haemolytic activity is a desirable trait in probiotic bacteria. Several authors have shown similar results [18–47].

In addition, the two strains were resistant to kanamycin, streptomycin, tetracycline, and vancomycin but were sensitive to amoxicillin, ampicillin, cephalotin, chloramphenicol, erythromycin, lincomycin, and penicillin. Moderate resistance was observed against gentamycin and neomycin. Our

results agree with those obtained in previous studies; the observed sensitivity to ampicillin, cephalotin, erythromycin, lincomycin, and penicillin and resistance to vancomycin are similar to results obtained by Zarour et al. [52], and sensitivity to chloramphenicol and ampicillin was also observed by Allameh et al. [18]. All studies showed resistance to vancomycin in *L. mesenteroides* strains. Vancomycin resistance is a general intrinsic feature that is linked to the presence of a pentadepsipeptide with a C terminal-lactate instead of a d-alanine in the peptidoglycan [53]. Few reports are available on other antibiotics.

TABLE 5: Antibiotic susceptibility of *Leuconostoc mesenteroides* strains.

Antibiotics	Symbol	$\mu\text{g}/\text{disc}$	Clear zone diameter (mm)			
			Z B7	Z8		
Amoxicillin	AMX	25	25	S	25	S
Ampicillin	AM	10	23	S	24	S
Céphalotin	CEF	30	23	S	24	S
Chloramphenicol	C	30	28	S	27	S
Erythromycin	E	15	27	S	28	S
Gentamycin	GM	10	18	I	18	I
Kanamycin	K	30	12	R	13	R
Lincomycin	L	15	25	S	25	S
Neomycin	N	30	16	I	16	I
Penicillin	P	6	23	S	24	S
Streptomycin	S	10	14	R	15	R
Tetracycline	TE	30	14	R	14	R
Vancomycin	VA	30	00	R	00	R

R: resistance, I: intermediate, and S: sensitive.

TABLE 6: Statistical analysis of the growth kinetics (variance analysis).

	Variance analysis						
	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>St. aureus</i>		<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>St. aureus</i>
Test number P	2	2	2	Repeatability variance σ_r^2	0.091	0.144	0.161
Result number N	20	20	20	cv repeatability	1.20%	2.17%	1.17%
Standard deviation	0.098	0.049	0.091	Reproducibility variance σ_R^2	0.22	0.441	2.673
Variance	0.009	0.002	0.008	cv reproducibility	3.42%	7.54%	13.52%
Mean (Log N)							
8.00	8.065	8.22					

SD, Var, and mean at 9 h of incubation.

Our *in vitro* studies demonstrated that the two *L. mesenteroides* strains had good probiotic profiles. These strains exhibited high viability at low pH levels, both in the presence of 2% of bile salt and in the presence of pepsin. These strains have acceptable susceptibility antibiotic profiles and are nonhaemolytic bacteria. *L. mesenteroides* strains B7 and Z8 could be ideal probiotic candidates.

These interactions can be the stimulation of one or more microorganism or may correspond to the inhibition of growth or metabolic activity. Inhibition may occur through the production of inhibitory substances or when one of the two microorganisms is inhibited by another. Inhibition could also be induced by reciprocal competition [54, 55]. Therefore, to study the behaviour of these two strains against food-borne pathogens, a kinetic profile of these strains was measured in both pure and mixed cultures.

Monitoring the pH and acidity showed a significant variability between pure and mixed culture, a result that can be explained by the production of organic acids (lactic and acetic acids). Therefore, we can conclude that the incubation time positively influenced the performance of the *L. mesenteroides* strains. Consequently, we can see that the amount of acid produced varies depending on the life stage of the bacterium.

The growth curve analysis in the mixed cultures showed a significant reduction of pathogen bacteria growth after 9 h of incubation during the late exponential phase of growth, which can explain the inhibition of the B7 strain towards *Listeria* and *Staphylococcus* through the production of inhibitory substances such as bacteriocins. Similar results were reported by Lacroix and Millette [56]. The antimicrobial activity of bacteriocin-producing LAB against pathogens was explained by the production of bacteriocins in broth cultures, which was estimated to be maximal after 9 hours of incubation, where the maximum number of bacteria had been attained in the early stationary phase of growth.

Study of the antimicrobial activity against *L. ivanovii* ATCC 19119 showed a small variation of repeatability (giving a lower limit of the variability of results), which indicates an internal dispersion close to the results in homogeneous coefficients of repeatability (1.54%, 1.71%, and 1.76%) (Table 6). Conversely, the pathogen strains showed variability in their growth rates, meaning that the observed potential showed an inhomogeneous distribution indicated by a coefficient of reproducibility of 3.48% (Table 6). The estimation of this activity against *S. aureus* ATCC 43300 displayed a minor, insignificant variability in the coefficients of repeatability

(1.60%, 2.65%, and 0.82%) (Table 6), which is explained by a lower antistaphylococcal capacity than the antilisterial capacity of *L. mesenteroides* B7.

5. Conclusion

In conclusion, the results of this study showed that the two strains of *Leuconostoc mesenteroides* (B7 and Z8) were found to possess good probiotic properties *in vitro*. Moreover, the kinetic studies showed that these two strains, especially B7, can be used as protective cultures to inhibit pathogenic bacteria growth in food. Therefore, these strains are good candidates for further investigation with *in vivo* studies to elucidate their potential health benefits and in fermentation studies to assess their technological characteristics for applications as novel probiotic starters.

Acknowledgment

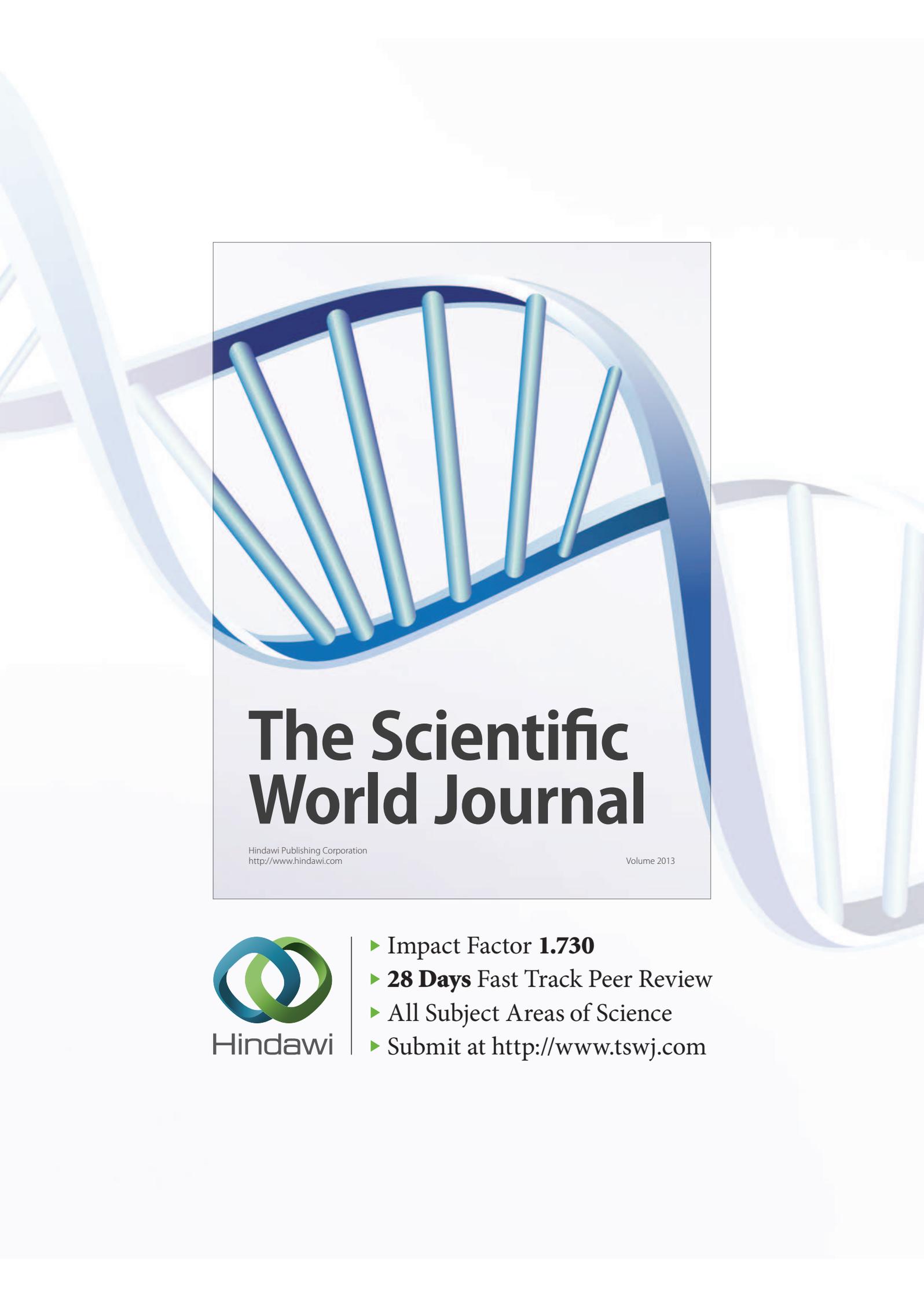
This work was funded by Project A1/0338133/11 funded by the Spanish Agency for International Cooperation and Development.

References

- [1] E. K. Barbour, N. H. Nabbut, W. M. Frerisch, and H. M. Al-Nakhli, "Inhibition of pathogenic bacteria by camel's milk: relation to whey lysozyme and stage of lactation," *Journal of Food Protection*, vol. 47, no. 11, pp. 838–840, 1984.
- [2] R. Yagil, O. Zagorski, and C. Van Creveld, "Science and camel's milk production," in *Actes du Colloque : Dromadaires et chameaux animaux laitier*, Nouakchott, Mauritanie, Octobre 1994.
- [3] M. Khaskheli, M. A. Arain, S. Chaudhary, A. H. Soomro, and T. A. Qureshi, "Physico-chemical quality of camel milk," *Journal of Agriculture Social Science*, vol. 1, no. 2, pp. 164–166, 2005.
- [4] B. Guessas, M. Hadadji, N. Saidi, and M. Kihal, "Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth in milk by lactic acid bacteria," *Durassat*, vol. 32, no. 5, pp. 53–60, 2005.
- [5] H. Labioui, L. Elmoualdi, M. El yachoui, and M. Ouhssine, "Sélection de souches de bactéries Lactiques antibactériennes," *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, vol. 144, no. 3-4, pp. 237–250, 2005.
- [6] A. Mezaini, N. E. Chihib, A. Dilmil Bouras, N. Nedjar-Arroume, and J. P. Hornez, "Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product," *Journal of Environmental and Public Health*, vol. 2009, Article ID 678495, 6 pages, 2009.
- [7] N. Benkerroum, A. Boughdadi, N. Bennani, and K. Hidane, "Microbiological quality assessment of Moroccan camel's milk and identification of predominating lactic acid bacteria," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 19, no. 6, pp. 645–648, 2003.
- [8] O. Hassaïne, H. Zadi-Karam, and N. E. Karam, "Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from raw milk of three breeds of Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*)," *African Journal of Biotechnology*, vol. 6, no. 14, pp. 1720–1727, 2007.
- [9] K. Khedid, M. Faïd, A. Mokhtari, A. Soulaymani, and A. Zinedine, "Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco," *Microbiological Research*, vol. 164, no. 1, pp. 81–91, 2009.
- [10] E. I. el Agamy, R. Ruppanner, A. Ismail, C. P. Champagne, and R. Assaf, "Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins," *Journal of Dairy Research*, vol. 59, no. 2, pp. 169–175, 1992.
- [11] N. Benkerroum, M. Mekkaoui, N. Bennani, and K. Hidane, "Antimicrobial activity of camel's milk against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*," *International Journal of Dairy Technology*, vol. 57, no. 1, pp. 39–43, 2004.
- [12] E. O. Khay, M. Idaomar, L. M. P. Castro, P. F. Bernárdez, N. S. Senhaji, and J. Abrini, "Antimicrobial activities of the bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria isolated from Moroccan dromedary milk," *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 51, pp. 10447–10455, 2011.
- [13] M. A. Daeschel, "Antibacterial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives," *Food Technology*, vol. 43, pp. 164–167, 1989.
- [14] T. Abee, L. Krockel, and C. Hill, "Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 28, no. 2, pp. 169–185, 1995.
- [15] J. Hugenholtz and M. Kleerebezem, "Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 10, no. 5, pp. 492–497, 1999.
- [16] A. Badis, D. Guetarni, B. Moussa Boudjema, D. E. Henni, and M. Kihal, "Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races," *Food Microbiology*, vol. 21, no. 5, pp. 579–588, 2004.
- [17] H. Drici, C. Gilbert, M. Kihal, and D. Atlan, "Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 108, no. 2, pp. 647–657, 2010.
- [18] S. K. Allameh, H. Daud, F. M. Yusoff, C. R. Saad, and A. Ideris, "Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*)," *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 16, pp. 3810–3816, 2012.
- [19] E. Ringø and F. J. Gatesoupe, "Lactic acid bacteria in fish: a review," *Aquaculture*, vol. 160, no. 3-4, pp. 177–203, 1998.
- [20] S. Torriani, G. Zapparoli, and F. Dellaglio, "Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, no. 10, pp. 4351–4356, 1999.
- [21] P. Bellengier, J. Richard, and C. Foucaud, "Nutritional requirements of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and subsp. *dextranicum* for growth in milk," *Journal of Dairy Research*, vol. 64, no. 1, pp. 95–103, 1997.
- [22] S. Rodgers, "Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 19, no. 4, pp. 188–197, 2008.
- [23] S. V. Hosseini, S. Arlindo, K. Böhme, C. Fernández-No, P. Calomata, and J. Barros-Velázquez, "Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 107, no. 4, pp. 1392–1403, 2009.
- [24] R. A. Kekkonen, E. Kajasto, M. Miettinen, V. Veckman, R. Korpela, and I. Julkunen, "Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and

- IFN- γ production," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 14, no. 8, pp. 1192–1203, 2008.
- [25] S. Supannikar and T. Sudsai, "Potential use of leuconostoc lactis isolated from fermented broken rice as a single starter culture for small-scale production of thai fermented rice noodle," in *Proceedings of the 21st International ICFMH Symposium, Evolving Microbial Food Quality and Safety*, IUMS/ICFMH, Aberdeen, Scotland, September 2008.
- [26] B. B. Budde, T. Hornbæk, T. Jacobsen, V. Barkholt, and A. G. Koch, "Leuconostoc carnosum 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 83, no. 2, pp. 171–184, 2003.
- [27] E. H. Drosinos, M. Mataragas, N. Xiraphi, G. Moschonas, F. Gaitis, and J. Metaxopoulos, "Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage," *Meat Science*, vol. 69, no. 2, pp. 307–317, 2005.
- [28] J. V. Mayeux, W. W. E. Sandine, and P. R. Elliker, "A selective medium for detecting Leuconostoc organisms in mixed strain starter cultures," *Journal of Dairy Science*, vol. 45, pp. 655–656, 1962.
- [29] D. A. Relman, T. M. Schmidt, R. P. MacDermott, and S. Falkow, "Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 327, no. 5, pp. 293–301, 1992.
- [30] K. Böhme, I. C. Fernández-No, J. M. Gallardo, B. Cañas, and P. Calo-Mata, "Safety assessment of fresh and processed seafood products by MALDI-TOF mass fingerprinting," *Food and Bioprocess Technology*, vol. 4, no. 6, pp. 907–918, 2011.
- [31] N. Saitou and M. Nei, "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 4, no. 4, pp. 406–425, 1987.
- [32] J. D. Thompson, D. G. Higgins, and T. J. Gibson, "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice," *Nucleic Acids Research*, vol. 22, no. 22, pp. 4673–4680, 1994.
- [33] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, "Basic local alignment search tool," *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, no. 3, pp. 403–410, 1990.
- [34] N. Xiraphi, M. Georgalaki, K. Rantsiou, L. Cocolin, E. Tsakalidou, and E. H. Drosinos, "Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131," *Meat Science*, vol. 80, no. 2, pp. 194–203, 2008.
- [35] H. P. Fleming, J. L. Etchells, and R. N. Costilow, "Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 30, no. 6, pp. 1040–1042, 1975.
- [36] S. F. Barefoot and T. R. Klaenhammer, "Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 45, no. 6, pp. 1808–1815, 1983.
- [37] S. A. Liasi, T. I. Azmi, M. D. Hassan, M. Shuhaimi, M. Rosfarizan, and A. B. Ariff, "Antimicrobial activity and anti-biotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product," *Malaysian Journal of Microbiology*, vol. 5, no. 1, pp. 33–37, 2009.
- [38] M. Kihal, H. Prevost, D. E. Henni, Z. Benmechernene, and C. Diviès, "Carbon dioxide production by leuconostoc mesenteroides grown in single and mixed culture with *Lactococcus lactis* in skim milk," *Scientific Research and Essays*, vol. 4, no. 11, pp. 1348–1353, 2009.
- [39] J. Baranyi and T. A. Roberts, "A dynamic approach to predicting bacterial growth in food," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 23, no. 3–4, pp. 277–294, 1994.
- [40] P. Dalgaard, "Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 26, no. 3, pp. 305–317, 1995.
- [41] M. Lachance, *Purification et caractérisation d'une bactériocine produite par Lactococcus lactis ssp. lactis mjc15* Mémoire maître des sciences [M.S. thesis], Université Laval, 2000.
- [42] S. Arlindo, P. Calo, C. Franco, M. Prado, A. Cepeda, and J. Barros-Velázquez, "Single nucleotide polymorphism analysis of the enterocin P structural gene of *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods," *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 50, no. 12, pp. 1229–1238, 2006.
- [43] C. A. Campos, Ó. Rodríguez, P. Calo-Mata, M. Prado, and J. Barros-Velázquez, "Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*)," *Food Research International*, vol. 39, no. 3, pp. 356–364, 2006.
- [44] I. Sumeri, L. Arike, K. Adamberg, and T. Paalme, "Single bioreactor gastrointestinal tract simulator for study of survival of probiotic bacteria," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 80, no. 2, pp. 317–324, 2008.
- [45] P. Prommadee, G. Wunwiboon, L. Kees, and N. Sunee, "Characterization of *Lactobacillus johnsonii* KUNN19-2 and *Pediococcus pentosaceus* KUNNE6-1 isolated from thai-style fermented pork (Nham) for their probiotic properties in the gastrointestinal tract and immunomodulation," *Kasetsart Journal: Natural Science*, vol. 46, no. 3, pp. 440–450, 2012.
- [46] S. Erkkilä and E. Petäjä, "Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use," *Meat Science*, vol. 55, no. 3, pp. 297–300, 2000.
- [47] A. A. Argyri, G. Zoumpoulou, G. Kimon-Andreas et al., "Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests," *Food Microbiology*, vol. 33, no. 1, pp. 282–291, 2013.
- [48] I. S. Surono, "In vitro probiotic properties of indigenous dadih lactic acid bacteria," *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, vol. 16, no. 5, pp. 726–731, 2003.
- [49] P. A. Maragkoudakis, G. Zoumpoulou, C. Miaris, G. Kalantzopoulos, B. Pot, and E. Tsakalidou, "Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products," *International Dairy Journal*, vol. 16, no. 3, pp. 189–199, 2006.
- [50] B. J. Seo, I. A. Rather, V. J. R. Kumar et al., "Evaluation of *Leuconostoc mesenteroides* YML003 as a probiotic against low-pathogenic avian influenza (H9N2) virus in chickens," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 113, no. 1, pp. 163–171, 2012.
- [51] FAO/WHO, *Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, FAO/WHO, London, Canada, 2002.
- [52] K. Zarour, Z. Benmechernene, M. Hadadji, B. Moussa-Boudjemaa, J. E. Henni, and M. Kihal, "Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie," *Nature & Technologie Revue*, vol. 8, pp. 39–47, 2012.
- [53] D. Hemme and C. Foucaud-Scheunemann, "*Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods," *International Dairy Journal*, vol. 14, no. 6, pp. 467–494, 2004.

- [54] O. Cholet, *Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire [Ph.D. thesis]*, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, 2006.
- [55] V. Monnet, E. Latrille, C. Béal, and G. Corrieu, "Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques," in *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments*, G. Corrieu and F. M. Luquet, Eds., pp. 512–592, Tec & Doc, Paris, 2008.
- [56] M. Lacroix and M. Millette, "Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria," US 20110236359 A1, 2011.



The Scientific World Journal

Hindawi Publishing Corporation
<http://www.hindawi.com>

Volume 2013



Hindawi

- ▶ Impact Factor **1.730**
- ▶ **28 Days** Fast Track Peer Review
- ▶ All Subject Areas of Science
- ▶ Submit at <http://www.tswj.com>