



UNIVERSITÉ FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1 (UFMC1)



INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION
ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES (I.N.A.T.A.A.)

N° d'ordre :

N° de série :

Thèse de Doctorat en Sciences
Spécialité : **Sciences Alimentaires**

**Caractérisation de souches de *Streptococcus thermophilus*
et *Streptococcus macedonicus* dans des laits fermentés
traditionnels algériens - Etude de quelques pré-requis
au potentiel probiotique**

Présentée par :

Tedj El Moulouk KHALDI

Soutenue le : **lundi 29 juin 2020**

Devant le Jury composé de :

Président(e) :	BARKAT Malika	Pr.	INATAA, UFMC 1
Rapporteur :	KHARROUB Karima	Pr.	INATAA, UFMC 1
Co-encadrant :	ROUX Emeline	Dr.	CALBINOTOX, Univ de Lorraine, France
Examineurs :	BAHRI Fathia	Dr.	INATAA, UFMC 1
	BENLOUNISSI Aicha	Dr.	ENSB, Constantine
	MECHAI Abdelbasset	Dr.	Univ. Larbi Tébessi, Tebessa
Invité :	LE ROUX Yves	Pr.	ENSAIA, Univ de Lorraine, France

Dédicaces

A la mémoire de mes chers grands parents

Houria et Makhlouf

Remerciements

Ah ! ce moment de remerciements tant attendu après de longues années ! Dans cette euphorie et cette délectation face à cet événement, me rendant désinvolte, j'ose penser à cette indélicatesse de ne soucier guère de mes lecteurs, si je pouvais j'aurais tout aussi à écrire une deuxième thèse rien que pour des remerciements, me dis-je et me rétracte. D'autant plus, d'aucuns ne me croiraient sur paroles animées par des sentiments intangibles, non étayées et non référencées...

Je me suffirai donc d'un torrent de remerciements, pourvu que, dans cet exercice, je n'oublie personne, d'autant plus que l'énumération des noms ne sera pas dans l'ordre.

*Je tiens à remercier très sincèrement les membres de mon jury de thèse, pour l'honneur qu'ils m'ont accordé et pour le temps qu'ils ont consacré à lire ce travail. Je cite madame la présidente **Malika Barkat** ainsi que les examinateurs : monsieur **Abdelbasset Mechai** et mesdames **Aicha Belounissi** et **Fathia Bahri**.*

Il est de mon devoir et il est tout à fait naturel que j'exprime ici d'abord toute ma reconnaissance et toute ma gratitude à ma directrice et mes codirecteurs de thèse qui ont dirigé ce travail et m'ont appris à grandir dans ce domaine de recherche, et je suis consciente de la chance qui m'a été donnée d'être encadrée par ces derniers.

*Mes remerciements vont particulièrement à madame **Karima Kharoub** qui a cru en moi et m'a conseillée et orientée. Surtout pour ses remarques judicieuses et précieuses, et je me souviendrai certainement de ces mots qui ont « rythmé » toute cette période : « il faudrait faire ceci, il faudrait voir avec cela, etc ». Je la remercie également pour ses qualités humaines et pour sa patience durant toutes ces années.*

*J'exprime toute ma gratitude à madame **Émeline Roux** pour sa disponibilité, sa réactivité et pour ses conseils précieux. Je la remercie pour ses relectures scrupuleuses qui m'étaient d'une grande utilité. Elle est l'une de ce que j'appelle « les personnes ressources », grâce à elle j'ai compris beaucoup de choses et j'ai pu avancer assez rapidement dans mes recherches. Je la remercie également pour ses qualités humaines, surtout pour son soutien et ses conseils de maman durant la grossesse et après l'accouchement. Longue vie à toute sa famille.*

*Effectivement de longues années depuis que j'ai atterri dans le bureau, comme il me l'avait rappelé lui-même avec son humour légendaire. « Tel un petit chat tu as débarqué à mon bureau à la recherche d'une thèse... ». Toute ma gratitude et ma reconnaissance vont à monsieur **Yves Le roux** d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenue tout au long de ces années. J'ai trouvé en lui, outre la profondeur, l'acuité de ses visions scientifiques ainsi que la perspicacité et la pertinence de ses remarques, la patience et la disponibilité dans la durée. Je souligne le mot patience, car il faut dire que, compte tenu du rythme et de la cadence du déroulement de ma thèse qui, il faut le reconnaître, a commencé par « l'éloge de la lenteur », il en fallait des réserves pour arriver à terme dans un monde animé par l'instantanéité et la vitesse. Une fois n'est pas coutume, un « artefact atypique » tombe en pleines préparations de la soutenance de ma thèse où des événements peu réjouissants voire dramatiques se déroulent à la même vitesse que la propagation à vive allure d'un virus virulent.*

Bien qu'il ne faille pas trop dramatiser, il n'en demeure pas moins que l'événement est marquant voire insolite qu'il faut souligner pour l'« histoire », du moins personnelle. Les partisans de l'humour noir diraient : « la soutenance au temps de Covid-19 ».

Convaincue que dans un travail de recherche, digne de ce nom, demandant de la rigueur et de l'objectivité et ne laissant aucune place au sentimentalisme et à la subjectivité, je rends hommage à celui qui a pensé à laisser cet endroit pour permettre aux chercheurs de sublimer leur réserve et

d'exprimer leur humanité librement.

Voilà pourquoi, face à cette éprouvante expérience que traverse l'humanité entière, j'exprime toute ma sympathie aux victimes infectées, et mes pensées vont aux familles endeuillées à cause de cette pandémie un peu partout dans le monde.

En tant que futur docteur, je suis tout à fait consciente que le doctorat n'est pas une fin en soi, loin s'en faut. Il y a eu un avant qui ne sera plus, et il y aura un après, et c'est là que le futur chercheur, entamant sa maturité scientifique, joue pleinement son rôle. Cette épreuve qui nous concerne tous, notamment nous les scientifiques, sera riche en enseignement et va sans doute chambouler certaines perceptions à maints égards.

Certes, le monde ne sera plus le même, il y aura certainement un avant et un après de cette pandémie, mais la vie poursuit son cours et les remerciements aussi.

Ce travail n'aurait pas été possible sans la contribution des deux laboratoires relevant de deux universités appartenant à deux États, respectivement le laboratoire de recherche ALNUTS à l'université de Constantine en Algérie et l'unité de recherche UR AFPA à l'université de Lorraine en France.

Toute ma gratitude à l'État algérien, via l'université de Constantine, de m'avoir attribué une bourse me permettant de réaliser une partie de mes recherches dans un laboratoire à l'étranger. Je remercie également l'État français qui, via l'université de Lorraine, a ouvert la porte aux étudiants et aux doctorants étrangers comme moi afin de poursuivre ou d'effectuer une partie de leurs études au sein des universités françaises.

*Toute ma reconnaissance et ma gratitude vont à monsieur **Abdelghani Boudjelal**, directeur de l'INATAA, d'avoir cru en moi, de m'avoir accompagné et encouragé depuis ma première formation à Nancy jusqu'à la fin de mon parcours de doctorante.*

*Comment pourrais-je trouver les mots pour remercier comme il se doit monsieur **Djamel Eddine Mekhancha**. Il est l'un « des personnes ressources », et sans lui je n'aurais pu être là où je suis. Il m'est impossible d'énumérer ici toutes ses qualités scientifiques et humaines, depuis que je le côtoie en tant que professeur et en tant que collègue par la suite, qui m'ont beaucoup inspirée.*

Je tiens à appuyer mes remerciements au personnel de l'institut l'INATAA ainsi qu'à tous les collègues qui m'ont aidée de près ou de loin, sans leur aide ce travail n'aurait pas pu s'achever.

*Mes remerciements vont particulièrement à **Amine Gomri** pour son soutien, pour la grande contribution qu'il a apportée pour que ce travail soit achevé. Merci pour ses « sauvetages » informatiques, ses traductions qui m'étaient d'une grande utilité et son agréable compagnie au laboratoire.*

*Je n'oublierai pas les longues discussions agrémentées d'humour partagées avec **Nadia Bachtarzi**. Merci d'avoir également partagé « la paillasse » avec moi.*

*Je remercie également docteur **Djenna** de la maison d'agriculture ainsi que les vétérinaires dans les services d'hygiène de la commune de Constantine pour leur contribution et aide appréciables.*

Je souhaite cette fois-ci adresser mes remerciements au laboratoire de recherche de l'autre côté de la méditerranée, à savoir UR AFPA relevant de l'université de Lorraine grâce auquel une grande partie de mon travail a été réalisée.

*Toute ma gratitude et ma reconnaissance à ce laboratoire qui m'a ouvert ses portes et m'a accueillie dans des conditions privilégiées. J'adresse particulièrement mes remerciements au directeur du laboratoire monsieur **Guido Richen** ainsi qu'à madame **Annie Darry-Mourot** pour les conditions du travail qu'ils m'ont réservées et assurées, sans lesquelles ce travail n'aurait pas pu être mené à bien.*

*Je tiens à remercier également madame **Claire Soligot-Hognon** pour son aide précieuse en culture cellulaire, pour ses orientations et ses conseils afin de maîtriser certaines techniques que j'ignorais jusqu'alors.*

*Je remercie chaleureusement **Émilie Lorson** pour son aide précieuse dans les manipulations, son soutien et surtout pour ses qualités humaines et pour son humour légendaire qui m'ont permis de passer des moments inoubliables. Longue vie à sa très charmante famille.*

*A cette ambiance bon enfant et propice pour un travail dans la bonne humeur contribuait **Mounira Kebouchi**. J'exprime ici tous mes remerciements à cette très chère amie pour sa disponibilité, pour son aide précieuse sur le plan scientifique et pour ses relectures minutieuses de notre publication. Je la remercie également pour ses qualités humaines raffinées et je lui souhaite, à elle et à toute sa famille, tout le bonheur du monde.*

*Je remercie également **Fleur, Faiza, Ophélie et Zeeshan** pour leur aide, leurs conseils ainsi que pour les bons moments passés ensemble au sein du laboratoire.*

J'entends d'ici quelques voix « ronchonnes » de certaines personnes, que j'aurais côtoyées ou croisées et qui m'auraient aidée, étonnées de ne pas lire leurs noms sur cette page. Je leur dis que cela est pour eux (elles), et qu'elles me pardonnent pour cet oubli.

Et que ces personnes me permettent également cette exception, car il est des voix douces et affectueuses qui restent gravées à jamais quelque part au fond de nous qui mettent du baume au cœur. Ces voix de notre entourage qui nous berçaient depuis toujours et qui n'ont eu de cesse de nous accompagner jusque là avec des encouragements, des « blâmes mignons », des soutiens d'envergure quand « ça coince ». Je ne serais certainement pas là à écrire ces lignes si je n'avais pas été baignée dans la sollicitude et le dévouement de cet entourage réconfortant. Ce sont mes sources d'énergie, ma raison de vivre. Je n'oublierai jamais ces voix affectueuses indispensablement itératives qui accompagnaient mon parcours : « Tu vas y arriver », « Courage, tu auras bientôt fini », etc.

*Toute ma gratitude va donc à mes parent(e)s, **Nadia, Naziha, Salima, Khelil**.*

*Mes remerciements vont particulièrement à **Chérif** qui était toujours là à mes côtés dans le meilleur ainsi que dans les moments difficiles. Je lui dois toute ma reconnaissance pour sa patience, sa disponibilité, son soutien indéfectible. Je lui souhaite une vie remplie de bonheur et de beaucoup de belles choses avec son épouse **Yasmine** et ses adorables enfants : **Anes et Firas**.*

*Un proverbe russe nous apprend ceci: "Qui a une magnifique sœur a beaucoup d'amis". **Nidhal** est la sœur unique mais sa présence donnait l'impression que nous étions plusieurs... Elle est la bonté incarnée! Qu'ils sont chanceux son époux **Hichem** et leur bout de chou **Aymen** ! Car question affection et tendresse, elle est une source inexhaustible. Je la remercie d'avoir été toujours là à mes côtés. Je lui souhaite ainsi qu'à sa petite famille tout le bonheur.*

*Sans oublier bien évidemment mon petit frère **Nazim**, un grand merci pour son soutien, ses préconisations de la vie, sa patience. Il était toujours à mes côtés, bien que ses adorables chats l'aient un peu occupé ces dernières années...*

Tous mes remerciements à mes cousins, à mes cousines et à ma belle famille pour leur soutien et leurs encouragements.

*A **Yasmine**, cette « quasi-soeur », qui reste la fidèle des fidèles, toujours à mes côtés dans les moments difficiles comme dans les moments de joie, je lui dois toute l'affection et ma reconnaissance pour sa présence, son soutien inconditionnel et sa contribution scientifique qui n'était pas négligeable dans la rédaction de ce travail. Longue vie à elle, à son fils **Majdouche** et à toute sa famille.*

*A **Amel**, en qui j'ai trouvé une amie « maternelle ». Je la remercie pour son incroyable bonté, ses merveilleuses valeurs humaines et son soutien indéfectible. Merci également à son époux **Mohamed El-Hadef EL Okki** pour son aide précieuse et sa contribution scientifique à ce travail. Je n'oublie pas de remercier tout particulièrement sa mère **tata Rachida** qui n'a jamais oublié ma part de ses gâteaux suaves. A toute sa famille, je souhaite tout le meilleur.*

Et pour être impartiale, à la fin de « mon parcours de remerciements », il ne me reste que de tourner vers ma petite famille.

Mon époux qui porte si bien son prénom Saber ! Pour ta patience, ton amour et ton soutien durant toutes ces années, je te remercie. Merci également pour ta contribution scientifique à ce travail, tes conseils avisés et tes encouragements qui m'ont été d'une grande aide.

Mon fils, ma raison d'être, ce bout de chou qui, « d'un point de vue haptonomique », ne s'arrêtait pas de cogner dans mon ventre, me titillant, alors que j'étais parfois en pleines manipulations au laboratoire. Ces « motilités intra-utérines » vont me rappeler certainement cette phase durant toute ma vie. Les années sont passées, il est là, et si tout va bien, la soutenance coïncidera avec son quatrième printemps...

Merci à vous tous !

Table des matières

	Page
Liste des abréviations	i
Liste des tableaux et des figures	ii
Introduction	01
Revue de littérature	05
<i>Chapitre 1 : Laits fermentés</i>	05
1. Laits fermentés : un savoir-faire-ancestral	05
2. Diversité des laits fermentés traditionnels : à chacun son lait fermenté	06
3. Laits fermentés traditionnels en Algérie : <i>lben</i> et <i>rayeb</i>	07
4. Laits fermentés traditionnels : des produits nourrissants au service de l'homme	09
<i>Chapitre 2 : Bactéries lactiques</i>	11
1. Caractéristiques générales des bactéries lactiques	11
2. Principaux genres de bactéries lactiques	11
3. Streptocoques	13
3.1. <i>Streptococcus thermophilus</i> : une espèce qui a fait ses preuves	14
3.1.1. Place de <i>Streptococcus thermophilus</i> dans le genre <i>Streptococcus</i>	14
3.1.2. Adaptation de <i>Streptococcus thermophilus</i> à sa niche écologique : le lait	15
3.1.3. Principales caractéristiques de <i>Streptococcus thermophilus</i>	16
3.1.4. Intérêt technologique de <i>Streptococcus thermophilus</i>	19
3.1.5. Intérêt probiotique de <i>Streptococcus thermophilus</i>	20
3.2. <i>Streptococcus macedonicus</i> : une espèce en devenir	21
3.2.1. Positionnement de <i>Streptococcus macedonicus</i> au sein du genre <i>Streptococcus</i>	22
3.2.2. <i>Streptococcus. macedonicus</i> : une espèce inoffensive au sein d'un groupe de pathogènes	24
3.2.3. Principales caractéristiques de <i>Streptococcus macedonicus</i>	26
3.2.4. Intérêts de <i>Streptococcus macedonicus</i>	28
4. Identification des bactéries lactiques	29
4.1. Approche phénotypique	29
4.2. Approche moléculaire	30
4.2.1. Analyse des séquences du gène codant l'ARNr 16S	30
4.2.2- Analyse de l'espace intergénique 16S-23S	31
4.2.3. Gène <i>SodA</i>	31

4.2.4. <i>Multi-locus Sequence Typing</i> (MLST)	32
4.2.5. Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD)	32
Chapitre 3 : Probiotiques	33
1. Concept de probiotique	33
2. Mode d'action et effets bénéfiques des probiotiques	33
3. Quelques Caractéristiques des probiotiques	35
3.1. Survie aux conditions du tractus gastro-intestinal : un pré-requis pour être probiotique	35
3.1.1. Présentation du tractus gastro-intestinal	37
3.1.2. Résistance des bactéries aux stress du tractus gastro-intestinal	38
3.1.2.1. Survie au stress acide	39
3.1.2.2. Survie au stress biliaire	44
3.2. Capacité d'adhésion aux cellules intestinales : une caractéristique importante des probiotiques	50
3.2.1. Épithélium intestinal : siège de l'adhésion	51
3.2.2. Mécanisme d'adhésion : un processus multifactoriel	54
3.2.3. Modèles cellulaires : un moyen pour l'étude de l'adhésion	56
Principales conclusions dégagées de la revue de littérature	58
Matériel & méthodes	59
1. Sélection des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Streptococcus macedonicus</i>	59
1.1. Collecte des échantillons	59
1.2- Isolement et identification phénotypique des isolats	60
1.2.1. Coloration de Gram	60
1.2.2. Recherche de la catalase	61
1.2.3. Dégradation de l'esculine	61
1.2.4. Croissance dans des milieux de culture hostiles (pH 9,6 et 6,5 % de NaCl)	61
1.2.5. Conservation des isolats	62
1.3. Identification génotypique des isolats	62
1.3.1. Extraction de l'ADN génomique	64
1.3.2. Amplification des gènes par PCR	65
1.3.2.1. Amplification des gènes codant l'ARNr 16S	66
1.3.2.2. Amplification des séquences intergénéiques 16S-23S	66
1.3.2.3. Amplification des séquences du gène <i>sodA</i>	66

1.3.2.4. Amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD-PCR)	67
1.3.2.5. Amplification des fragments internes de gènes de ménage (MLST)	67
1.3.3. Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR	68
1.3.4. Purification des produits de PCR	70
1.3.5. Séquençage	71
1.3.6. Analyse des séquences nucléotidiques	71
1.3.6.1. Alignement avec les séquences nucléotidiques des banques de données biologiques	71
1.3.6.2. Etude phylogénétique	72
1.3.7- Numéros d'accèsion des séquences nucléotidiques	72
2. Capacité acidifiante des isolats en lait	73
3. Tests de survie <i>in vitro</i> aux conditions simulant le tractus gastro-intestinal	73
3.1. Test de survie à l'acidité	73
3.2. Test de survie aux sels biliaires	74
4. Adhésion <i>in vitro</i> des souches aux cellules épithéliales intestinales	76
4.1. Culture cellulaire	76
4.2. Test d'adhésion	77
5. Analyse statistique des résultats	79
Résultats & discussions	81
1. Isolement et identification des isolats	81
1.1. Identification phénotypique des isolats	82
1.2. Identification génotypique des isolats	88
1.2.1. Analyse du gène codant l'ARNr 16S	88
1.2.1.1. Distribution des isolats de <i>Streptococcus thermophilus</i> dans nos échantillons	91
1.2.1.2. Distribution des isolats de <i>Streptococcus macedonicus</i> dans nos échantillons	92
1.2.2. Analyse de l'espace intergénique 16S-23S	94
1.2.2.1. Isolats de <i>Streptococcus thermophilus</i>	94
1.2.2.2. Isolats de <i>Streptococcus macedonicus</i>	95
1.2.3. Analyse de la séquence du gène <i>sodA</i>	95
1.2.4. Résultats de l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD)	96
1.2.5. Résultats de la méthode MLST et étude phylogénétique	97
1.2.5.1. Cas des isolats de <i>Streptococcus thermophilus</i>	98
1.2.5.1. Cas des isolats de <i>Streptococcus macedonicus</i>	102
2. Caractérisation des isolats sur la capacité d'acidification en lait	106

2.1. Acidification du lait non enrichi	107
2.1.1. Acidification du lait par les isolats de <i>Streptococcus thermophilus</i>	107
2.1.2. Acidification du lait par les isolats de <i>Streptococcus macedonicus</i>	109
2.2. Acidification du lait enrichi en bacto-tryptone <i>versus</i> lait	111
2.2.1. Cas de <i>Streptococcus thermophilus</i> LF9	112
2.2.2. Cas des isolats de <i>Streptococcus macedonicus</i>	112
3. Comportement des souches aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal	115
3.1. Survie aux conditions acides	116
3.2. Survie aux sels biliaires	122
3.3. Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales <i>in vitro</i>	128
3.3.1. Choix du support cellulaire pour l'étude de l'adhésion	130
3.3.1. Adhésion des souches aux cellules eucaryotes	132
Synthèse des résultats & discussion générale	138
Conclusion générale & perspectives	147
Références bibliographiques	149
Annexes	
Résumé (version arabe)	
Résumé (version anglaise)	
Résumé (version française)	

Liste des abréviations

AEC :	Avant l'Ere Commune
ATR :	<i>Acid Tolerance Response</i>
B. :	<i>Bifidobacterium</i>
L. :	<i>Lactococcus</i>
Lb. :	<i>Lactobacillus</i>
S. :	<i>Streptococcus</i>
BLAST :	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
EC :	Ere commune
EDTA :	Acide Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EFSA :	<i>European Food Safety Authority</i> (autorité européenne de sécurité des aliments)
EPS :	Exopolysaccharide
FAO :	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)
FDA :	<i>Food and Drug Administration</i> (administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments)
DMEM :	<i>Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium</i>
DO :	Densité optique
GRAS :	<i>Generally Recognized As Safe</i> (généralement reconnu comme inoffensif)
HBSS :	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (solution de sels équilibrés de Hanks)
MLST :	<i>Multi-locus Sequence Typing</i> (typage par séquençage multilocus)
MSB :	Mélange équimolaire de sels biliaires
PBS :	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampon phosphate salin)
PCR :	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (réaction de polymérisation en chaîne)
PTS :	<i>PhosphoTransferase System</i>
p/v :	Poids par volume
QPS :	<i>Qualified Presumption of Safety</i> (présomption d'innocuité reconnue)
RAPD :	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (amplification aléatoire d'ADN polymorphe)
SB :	Sels biliaires
SEM :	<i>Standard Error of the Mean</i> (erreur type)
Subsp :	Sous espèce
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
TIM :	<i>TNO Intestinal Model</i> (modèle intestinal TNO)
UFC :	Unité formant colonie
WHO :	<i>World Health Organization</i> (organisation mondiale de la santé)

*Liste des tableaux
& des figures*

Liste des Tableaux

	Page
Tableau 01. Composition chimique moyenne du <i>lben</i> traditionnel algérien	09
Tableau 02. Familles et genres de bactéries lactiques	12
Tableau 03. Concentration des sels biliaires dans différents tissus de l'organisme humain	45
Tableau 04. Distribution des mucines le long du tractus gastro-intestinal	54
Tableau 05. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des différents gènes par réaction PCR	65
Tableau 06. Séquences des amorces et fonctions des gènes du schéma MLST	69
Tableau 07. Tailles d'amplicons attendues dans les réactions PCR pour étude MLST	70
Tableau 08. Préparation des solutions de sels biliaires	75
Tableau 09. Isolement de coques lactiques thermophiles	82
Tableau 10. Caractérisation physiologique des coques lactiques thermophiles	85
Tableau 11. Typage moléculaire (ARNr 16S, ITS 16S-23S, <i>sodA</i>) des isolats sélectionnés	89
Tableau 12. Variabilité génétique au niveau des neuf loci étudiés par MLST pour l'espèce <i>S. thermophilus</i>	99
Tableau 13. Allèles (MLST) des isolats <i>S. thermophilus</i> LF9 et LA14 par rapport à la collection de 30 souches de <i>S. thermophilus</i> de Junjua <i>et al.</i> (2016)	100
Tableau 14. Diversité génétique au niveau des dix loci de <i>S. macedonicus</i>	104
Tableau 15. Profils alléliques obtenu par étude MLST des quatre isolats de <i>S. macedonicus</i> et de la souche <i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198	104
Tableau 16. Synthèse des principaux résultats	146

Liste des figures

	Page
Figure 01. Histoire du lait à travers la traite de vache représentée dans une mosaïque égyptienne	06
Figure 02. Procédé de fabrication des laits fermentés traditionnels algériens (<i>Lben</i> et <i>Rayeb</i>)	08
Figure 03. Dendrogramme représentatif de la position taxonomique de <i>S. macedonicus</i>	24
Figure 04. Anatomie du tractus gastro-intestinal	38
Figure 05. Mécanismes de réponse des bifidobactéries au stress biliaire	48
Figure 06. Représentation schématique de l'organisation de la paroi intestinale	53
Figure 07. Points de collecte des produits laitiers fermentés	60
Figure 08. Schéma de la sélection de <i>S. thermophilus</i> et <i>S. macedonicus</i>	63
Figure 09. Principe général de l'adhésion <i>in vitro</i> des bactéries aux cellules épithéliales intestinales	80
Figure 10. Aspects macroscopique et microscopique de l'isolat PA	83
Figure 11. Aspects macroscopique et microscopique de l'isolat LF9	84
Figure 12. Profil électrophorétique (RAPD) pour les quatre souches de <i>S. macedonicus</i>	97
Figure 13. Liens phylogénétiques des isolats <i>S. thermophilus</i> LF9 et <i>S. thermophilus</i> LA14 parmi 30 souches de cette espèce et trois souches de <i>S. salivarius</i>	101
Figure 14. Liens phylogénétiques entre les souches de <i>S. macedonicus</i> (LK13, P2, LS5, PA et ACA-DC 198) et trois souches de <i>S. gallolyticus</i>	105
Figure 15. Cinétiques d'acidification en lait avec ou sans bacto-tryptone des isolats <i>S. thermophilus</i> LF9, LA14 et de la souche de référence <i>S. thermophilus</i> LMD-9	108
Figure 16. Cinétiques d'acidification en lait des isolats <i>S. macedonicus</i> et de la souche <i>S. thermophilus</i> LMD-9	110
Figure 17. Cinétiques d'acidification en lait avec ou sans bactotryptone des isolats <i>S. macedonicus</i> PA (A) et <i>S. macedonicus</i> P2 (B) ainsi que la souche <i>S. thermophilus</i> LMD-9	113
Figure 18. Cinétiques d'acidification en lait avec ou sans bactotryptone des isolats <i>S. macedonicus</i> LS5 (A) et <i>S. macedonicus</i> LK13 (B) ainsi que la souche <i>S. thermophilus</i> LMD-9	114
	117

Figure 19.	Survie des souches de <i>S. macedonicus</i> , <i>S. thermophilus</i> LF9, <i>S. thermophilus</i> LMD-9 et <i>Lb. rhamnosus</i> GG (LGG) après 2 h d'exposition à pH 4 (A), pH 3 (B) et 1 h à pH 2 (C) par rapport au contrôle négatif pH 7	
Figure 20.	Survie des souches de <i>S. macedonicus</i> , <i>S. thermophilus</i> LF9, <i>S. thermophilus</i> LMD-9 et <i>Lb. rhamnosus</i> GG (LGG) après 2h d'exposition au MSB aux concentrations de 4 mM (A), 5 mM (B), 6 mM (C) et 10 mM (D) comparée au contrôle négatif 0 mM	123
Figure 21.	Microplaque pour culture cellulaire	130
Figure 22.	Adhésion <i>in vitro</i> des souches <i>Lb. rhamnosus</i> GG (LGG) et <i>S. thermophilus</i> LMD-9 en puits <i>versus</i> inserts aux cellules épithéliales Caco-2 TC7	131
Figure 23.	Adhésion <i>in vitro</i> des souches <i>Lb. rhamnosus</i> GG (LGG) et <i>S. thermophilus</i> LMD-9 en puits <i>versus</i> inserts aux cellules épithéliales HT-29 MTX	131
Figure 24.	Adhésion <i>in vitro</i> des souches de <i>S. macedonicus</i> , <i>S. thermophilus</i> LF9, <i>S. thermophilus</i> LMD-9 et <i>Lb. rhamnosus</i> GG (LGG) aux cellules épithéliales Caco-2 TC7	133
Figure 25.	Adhésion <i>in vitro</i> des souches de <i>S. macedonicus</i> , <i>S. thermophilus</i> LF9, <i>S. thermophilus</i> LMD-9 et <i>Lb. rhamnosus</i> GG (LGG) aux cellules épithéliales HT29-MTX	133
Figure 26.	Adhésion <i>in vitro</i> des souches de <i>S. macedonicus</i> , <i>S. thermophilus</i> LF9, <i>S. thermophilus</i> LMD-9 et <i>Lb. rhamnosus</i> GG (LGG) aux cellules épithéliales HT29-CL16E	134

« Que ton aliment soit ta première médecine »

Hippocrate.

Introduction

Le lien entre alimentation et santé, aussi vieux soit-il, est aujourd'hui incontesté. En effet, depuis l'antiquité et chez plusieurs peuples anciens, les croyances selon lesquelles les aliments sont qualifiés de poison ou de médicament ont contribué à donner une dimension « santé » à l'alimentation au-delà de sa fonction nutritive (Hubert, 2001). Cette dimension a évolué au fil du temps et s'est renforcée actuellement notamment à cause de la forte prévalence de nombreuses maladies chroniques dans lesquelles le type d'alimentation est considéré comme l'un des déterminants majeurs. Dès lors, la nécessité d'explorer le potentiel préventif, voire « thérapeutique » des aliments s'est exprimée à travers l'émergence d'aliments « santé » ou fonctionnels. Ce concept concerne des ingrédients de l'aliment ayant une activité biologique c'est-à-dire qu'ils sont à même de moduler des fonctions cibles de l'organisme, et de ce fait, d'améliorer la santé ou de réduire le risque d'apparition de maladies (Pascal *et al.*, 2008 ; Doyon *et al.*, 2012 ; Martirosyan et Singh, 2015). Ces ingrédients peuvent être des prébiotiques, des vitamines, des minéraux, ou encore des microorganismes probiotiques (Syngai *et al.*, 2016). Ces derniers ont fait le succès des aliments fonctionnels grâce à leurs propriétés biologiques de plus en plus documentées et à leur nature vivante pouvant se substituer aux additifs chimiques suscitant ainsi l'intérêt des consommateurs et des industriels (Chen *et al.*, 2014 ; Verruck *et al.*, 2019).

En fait, la notion de probiotique est ancienne. Depuis le début du XX^e siècle, les scientifiques ont suggéré les effets bénéfiques de certains microorganismes, généralement apportés par l'alimentation, sur la santé. A ce jour, les probiotiques sont officiellement définis comme étant « des microorganismes vivants qui, lorsque consommés en quantités adéquates, exercent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, au-delà des effets nutritionnels traditionnels » (FAO/WHO, 2001). Le bénéfice santé qui leur est attribué est de plus en plus démontré, ces dernières années, par des études *in vivo* réalisées soit sur l'homme, soit sur des modèles animaux. Ces études mettent en exergue les activités anti-inflammatoires, anti-diarrhéiques, anti-allergiques, anti-microbiennes, immunomodulantes, hypocholestérolémiantes, *etc.* des probiotiques ainsi que leur rôle dans la prévention et la modulation de certaines maladies telles que le cancer, le diabète de type 2 et l'obésité (Marteau, 2004 ; EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2010 ; Faure *et al.*, 2013 ; Savaiano, 2014 ; Maldonado Galdeano *et al.*, 2015 ; he *et al.*, 2017 ; Cerdó *et al.*, 2019 ; Liu *et al.*, 2019 ; Ranjbar *et al.*, 2019).

Outre les effets bénéfiques essentiels à la définition de probiotique, d'autres critères, relatifs aux propriétés des microorganismes, ont été définis par le comité mixte d'experts de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture FAO et de l'Organisation Mondiale de la

Santé OMS (FAO/WHO, 2002) comme nécessaires à la caractérisation et à la sélection des probiotiques. Ces critères incluent l'origine écologique des bactéries (origines humaine ou/et alimentaire), leur tolérance aux conditions hostiles de l'estomac et l'intestin grêle et leur capacité à adhérer, même de manière transitoire, aux muqueuses intestinales (Chae *et al.*, 2013; Uroic *et al.*, 2016). En effet, de nombreuses études affirment que l'effet bénéfique sur l'hôte n'est effectif que lorsque les bactéries probiotiques sont vivantes (Taverniti et Guglielmetti, 2011 ; Lahtinen, 2012 ; Sugahara *et al.*, 2017). Des études ont montré que leur capacité de survie à un pH bas et aux conditions de stress biliaires était très variable selon le genre, l'espèce et même la souche (Reale *et al.*, 2015 ; Junjua *et al.*, 2016). L'adhésion permet aux bactéries de coloniser l'intestin et d'exercer leurs effets bénéfiques (inhibition des microorganismes pathogènes, immunomodulation, *etc.*). Il est à souligner que cette caractéristique est également espèce et souche-dépendante (Van Tassell et Miller, 2011 ; Kumar et Kumar, 2015). En se basant sur le principe de variabilité entre souches, ces pré-requis, qui sont très certainement nécessaires aux bactéries afin d'exprimer pleinement leur pouvoir probiotique, ouvrent la voie à l'exploration de nouvelles souches à potentiel probiotique. *A fortiori*, plusieurs souches algériennes ont exprimé différents niveaux de résistance aux conditions simulées de l'environnement gastro-intestinal et d'adhésion aux cellules intestinales (Bahri *et al.*, 2014 ; Mermouri *et al.*, 2017 ; Bahloul *et al.*, 2019 ; Gheziel *et al.*, 2019).

Il faut noter que les probiotiques sont dans la majorité des cas des bactéries lactiques directement impliquées dans la fermentation des produits alimentaires. Ils sont souvent incorporés aux aliments fermentés avec une prédilection pour les matrices laitières (Sarao et Arora, 2017). D'ailleurs, on prêtait aux produits laitiers fermentés des vertus thérapeutiques depuis longtemps, et ils sont à l'origine du concept de probiotique. Ils représentent de ce fait une source indéniable de bactéries lactiques diverses à potentiel probiotique. Pour exemple, une souche de *Lb. casei* Zhang isolée de lait fermenté traditionnel *koumiss* de Mongolie a permis d'atténuer les troubles digestifs et les infections des voies respiratoires chez des populations étudiées. Cette souche présente également la capacité de maintenir l'homéostasie de l'immunité de l'hôte et d'inhiber les microorganismes pathogènes tels que *Pseudomonas* et *Acinetobacter*. D'autres souches isolées de laits fermentés traditionnels tels que les *kefir* et *katak* (portugais) ainsi que des produits laitiers fermentés iraniens, et algériens ont montré des propriétés antimicrobiennes, antifongiques et hypocholestérolémiantes (Kacem et Kaid-Harche, 2008 ; Huang *et al.*, 2013 ; Iranmanesh *et al.*, 2014 ; Dahou *et al.*, 2015 ; Dong *et al.*, 2015 ; Ghosh *et al.*, 2019 ; Slattery *et al.*, 2019).

Un processus de fabrication traditionnel peut permettre de découvrir de nouvelles souches probiotiques et ajouter ainsi de la diversité. C'est la raison pour laquelle, nous nous sommes intéressés dans ce travail aux laits fermentés traditionnels algériens *lben* et *rayeb* issus de fermentation spontanée du lait de vache cru. La coagulation du lait conduit à un caillé onctueux qui est le *rayeb*, celui-ci subit un barattage et un écrémage pour donner un lait fermenté acidulé et frais à savoir le *lben*. Ce procédé traditionnel, outre des conditions environnementales particulières (géographie, climat, *etc.*), confère à ces laits fermentés la particularité de renfermer de nouvelles souches de bactéries lactiques, différentes des souches commerciales, et pouvant être considérées comme de bons candidats probiotiques (Bensalah, 2009 ; Prashant *et al.*, 2009).

Dans cette optique, nous avons ciblé deux espèces du genre *Streptococcus* à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Streptococcus macedonicus*. La première étant la seule du genre à posséder le statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (FDA, 2002 ; 2012), et à être largement utilisée en industrie laitière pour ses propriétés technologiques mais également probiotiques (Pastink *et al.*, 2009 ; Burton *et al.*, 2017). Parmi les plus avérées de ces propriétés est sa capacité d'améliorer la digestion du lactose pour les intolérants au lactose (Savaiano, 2014).

La seconde espèce s'est distinguée dans le même genre par sa non-pathogénie et son origine alimentaire puisqu'elle a souvent été isolée dans des produits laitiers fermentés dont le premier était un fromage à pâte filée en Macédoine, ce qui lui a valu le nom de *Streptococcus macedonicus* (Tsakalidou *et al.*, 1994). Cette espèce possède des caractéristiques phénotypiques proches de celles de *Streptococcus thermophilus*, et à l'instar de celle-ci, elle aurait des propriétés technologiques et probiotiques prometteuses (Tsakalidou *et al.*, 1998 ; De Vuyst et Tsakalidou, 2008 ; Blaiotta *et al.* 2011 ; Laiño *et al.*, 2015, 2019 ; Tarrah *et al.*, 2018a). Toutefois, peu d'informations existent sur cette espèce, et par conséquent peu de souches ont été exploitées jusqu'à présent. À ce jour, un seul génome complètement assemblé est disponible dans les bases de données (souche ACA-DC 198 ; Papadimitriou *et al.* 2012), les six autres génomes étant publiés sous forme de contigs (Vendramin *et al.*, 2014 ; Papadimitriou *et al.*, 2016 ; Treu *et al.*, 2017).

Dans ce contexte, notre travail s'inscrit dans le registre de la sélection *in vitro* de nouvelles souches de streptocoques thermophiles non-pathogènes : *Streptococcus thermophilus* et *Streptococcus macedonicus* dans des laits fermentés traditionnels algériens et la mise en évidence de quelques propriétés préalables à l'exercice d'un pouvoir probiotique (la résistance

aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal et l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales).

Le présent travail sera abordé comme suit :

1- Pour commencer, une revue de littérature sera présentée s'articulant autour de trois chapitres :

1) les laits fermentés traditionnels, leur diversité dans le monde et, plus particulièrement les *lben* et *rayeb* en Algérie ; 2) les bactéries lactiques, l'accent sera mis sur les deux espèces *Streptococcus thermophilus* et *Streptococcus macedonicus* ; 3) les probiotiques en se focalisant sur deux caractéristiques importantes, à savoir la survie aux conditions du tractus gastro-intestinal et la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales ;

2- Dans un deuxième temps, les expérimentations menées dans ce travail seront décrites dans la partie matériel et méthodes, en l'occurrence les différentes étapes d'isolement, d'identification phénotypiques et génotypiques et la caractérisation de l'activité acidifiante des isolats. Les méthodes d'évaluation de la capacité de résistance aux pH bas et aux sels biliaires ainsi que l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales dans trois modèles cellulaires seront également présentées dans cette partie ;

3- Les résultats obtenus à l'issue de nos expérimentations seront présentés et discutés dans la partie résultats et discussions avec une synthèse des principaux résultats ;

4- Enfin, nous terminerons par une conclusion générale mettant en exergue les perspectives qui se dégagent de ce travail.

Revue de littérature

1. Laits fermentés : un savoir-faire ancestral

Les laits fermentés traditionnels comme leur nom l'indique sont des produits issus de la fermentation spontanée du lait. L'origine de leur consommation est étroitement liée à celle du lait, celle-ci remonte probablement à l'ère de la domestication et de l'élevage des animaux depuis au moins 10 000 ans. Des peintures rupestres et des fresques anciennes témoignent de la place du lait dans la consommation des Sumériens, des Babyloniens, des Égyptiens et des Indiens (figure 01). En effet, au-delà de son aspect nutritif, une valeur symbolique positive lui est attribuée jusqu'à ce jour. Le lait représente par sa blancheur, la lumière et la fécondité pour les Indiens hindouistes. Il est aussi d'usage pour les *Naouris* des steppes d'Asie centrale de se souhaiter « du blanc dans sa vie » au Nouvel An, en référence à la blancheur du lait, symbole du bonheur et d'abondance (Tamime, 2003 ; Bourlioux, 2007 ; Redlingshöfer et Soyeux, 2010).

Toutefois, la fragilité et l'instabilité du lait ont nécessité sa transformation par les anciennes populations en vue d'allonger sa durée de conservation et de stockage. Sans doute, une fermentation involontaire du lait avait permis à ces populations de constater que le produit caillé obtenu se conservait mieux que le lait frais. Cela a donné naissance au lait fermenté, et ce dès le néolithique comme le suggère cette preuve archéologique, en l'occurrence des peintures rupestres, datant de 5000 à 6000 ans avant l'ère commune (AEC), relevées dans des grottes en Libye, attestant la transformation du lait. De même, les civilisations du Croissant fertile et l'Égypte antique étaient suffisamment avancées dans l'agriculture et la transformation du lait. En Asie centrale, les laits fermentés étaient bien présents, et sont parvenus en Turquie au VIII^e siècle avant notre ère via les Balkans. Vers 630 (AEC), des écrits arabes faisaient mention du lait fermenté « *Leben* », et un peu plus tard, Pline, l'écrivain et naturaliste romain du premier siècle de notre ère faisait lui aussi mention dans ses écrits de la transformation du lait par les tribus *barbares*. Au XII^e siècle, des monographies faisaient mention de la célèbre histoire de Gengis Khan qui adopta le lait fermenté après l'avoir découvert chez les populations mongoles, et qui est devenu par la suite un mode d'alimentation pour lui et ses troupes (Tamime, 2003 ; Pernoud, *et al.*, 2005 ; Bourlioux, 2007 ; Savadogo et Traore, 2011).

En Afrique du nord, les laits fermentés semblent être l'héritage du brassage de la culture berbère et de celle des différentes civilisations qui s'y étaient succédées, à savoir les civilisations grecque, phénicienne, égyptienne, vandale, arabe et ottomane (Benkerroum *et al.*, 2013). Il semblerait alors que le lait fermenté ait connu un grand essor à travers les siècles grâce au savoir-faire et aux compétences culinaires des populations, et à ce jour, ce produit trouve toute sa place dans l'alimentation de par le monde.



Figure 01. Histoire du lait à travers la traite de vache représentée dans une mosaïque égyptienne (Granger Historical Picture Archive / Alamy Banque D'Images. <https://www.alamyimages.fr/photo-image-egypte-bovins-c-b-2300-nmilking-les-vaches-la-peinture-tombe-egyptienne-2300-c-b>.

(Consulté le 02. 04. 2019)

2. Diversité des laits fermentés traditionnels : à chacun son lait fermenté

Du fait de son histoire et de ses multiples origines, le lait fermenté est largement produit dans de nombreuses régions du monde, aujourd'hui majoritairement selon un procédé de fermentation contrôlé et industrialisé. Parallèlement, les laits fermentés fabriqués de manière traditionnelle subsistent encore dans des régions disparates du monde, sous des dénominations différentes et des procédés de fermentation le plus souvent spontanée au gré des microorganismes indigènes du lait employé et de l'environnement. A cela s'ajoutent l'origine animale et géographique du lait qui donnent également des notes variées, quoique voisines, des textures et des goûts aux différents laits fermentés existant à travers le monde.

Parmi les laits fermentés traditionnels consommés dans le monde, figurent le lait *ribot* en France, précisément en Bretagne, qui est un résidu de la fabrication du beurre au goût aigrelet. En Grèce, des laits fermentés traditionnels existent depuis l'antiquité, tels que les yaourts égouttés ou les laits fermentés par des levains non spécifiques, tel que *oxygala*, qui correspond à un caillé de lait salé ou encore un lait aigre ajouté au lait récent pour le faire aigrir selon Pline (Bourlioux, 2007). En Asie centrale et en Europe orientale, le *koumis* (ou *koumyss* du russe et *kymyz* du tatar) est le nom attribué au lait (le plus souvent de jument) fermenté acidulé et alcoolisé consommé depuis longtemps par les populations nomades des steppes d'Asie centrale. De même, le *kéfir* est le résultat d'une fermentation alcoolique du lait par un mélange symbiotique de bactéries lactiques, de levures et de moisissures issues des graines de *kéfir*, le transformant en une boisson fermentée mousseuse.

Originaire de la région des Balkans et le massif caucasien, le *kéfir* est populaire dans de nombreux pays d'Europe de l'Est, mais également dans les pays scandinaves et l'Amérique du Nord (Tamime, 2003 ; Wszolek *et al.*, 2006 ; Savadogo et Traore, 2011).

Des dénominations proches renvoyant au lait fermenté (à température ambiante ou par chauffage) baratté ou caillé, avec ou sans ajout de levains naturels, sont retrouvés généralement au Moyen-Orient et en Afrique du Nord, tels que *lben*, *leben* ou *laban*. Cette appellation est commune dans les pays du Maghreb et beaucoup de pays arabes ; *raab* aux Émirats Arabes Unis ; *rob* au Soudan ; *gariss* issu du lait de chamelle en Égypte et au Soudan (Wilson, 2017). En Afrique, la consommation des laits fermentés traditionnels est importante ; ces produits se déclinent en laits fermentés écrémés barattés et entiers ressemblant à un caillé. Parmi les laits fermentés écrémés, il existe le *katch* (wolof) ou *kossam kaadam* (peul) au Sénégal, le *rouaba* (arabe) ou *pendidam* (peul) au Tchad, ou l'*arera* (amharique) en Éthiopie. Quant au caillé de lait fermenté, nous retrouvons le *m'bannick* (wolof) au Sénégal, le *rayeb* (arabe) au Tchad ou l'*ergo* (amharique) en Éthiopie (Duteurtre *et al.*, 2003). De la même manière, ces laits fermentés se retrouvent en Afrique du Nord, notamment dans le Maghreb (Maroc, Algérie et Tunisie), sous les dénominations de *rayeb* pour le caillé de lait et *lben* désignant le lait fermenté écrémé et baratté au goût légèrement acidulé.

3. Lait fermentés traditionnels en Algérie : *lben* et *rayeb*

En Algérie, la tradition des produits laitiers est bien ancrée, elle a contribué à imprégner la culture algérienne à travers les générations. Le *lben* et le *rayeb* (ou *ikil* en kabyle, et *aghi yetchlen* en chaoui) sont les principaux laits traditionnellement fermentés consommés dans ce pays. Malgré leur industrialisation, la fabrication des laits fermentés traditionnels occupe toujours une place importante dans l'alimentation algérienne. Très appréciés pour leur agréable goût, le *lben* et le *rayeb* accompagnent souvent les mets algériens tel que le couscous, et ils sont aussi servis dans les occasions (fêtes de mariage, fêtes religieuses, *etc.*). A la campagne, le *lben* et le *rayeb* sont toujours présents dans les fermes, destinés à l'autoconsommation ou à la consommation locale, et un peu partout en ville, ils sont vendus par les marchands de lait.

Lben et *rayeb* sont obtenus traditionnellement par fermentation spontanée à température ambiante, pendant 24 à 72 h selon les saisons, du lait cru essentiellement d'origine bovine puisque plus de 80% de la production laitière est assurée par le cheptel bovin (Bencharif, 2001 ; Bessaoud *et al.*, 2019). A moindre mesure, les laits de chèvre, de brebis et de chamelle sont à l'origine de ces produits.

La coagulation du lait aboutit à un caillé qui peut être consommé tel quel : c'est le *rayeb*, un lait fermenté entier onctueux. Le caillé peut ensuite être baratté pendant une quarantaine de minutes avec addition d'eau, tiède ou froide selon la température du lait, pour rassembler les grains de beurre (figure 02). Après extraction du beurre, le liquide épais résiduel constitue le *lben* : ce fameux lait fermenté écrémé frais et légèrement acidulé (Benkerroum et Tamime, 2004 ; Claps et Morone, 2011).

Traditionnellement, le barattage était réalisé manuellement dans une outre en peau de chèvre appelée *chekoua*, recevant le caillé (*rayeb*). Celui-ci était agité vigoureusement dans l'outre, généralement suspendue à un trépied en bois, jusqu'à fluidisation du contenu et agrégation des particules de beurre. Actuellement, et bien que certains laitiers et certaines familles d'éleveurs disposent toujours d'outres ou de barattes en bois manuelles, le barattage électrique a progressivement remplacé la technique manuelle, réduisant ainsi l'effort physique et améliorant les conditions d'hygiène (Benkerroum et Tamime, 2004).

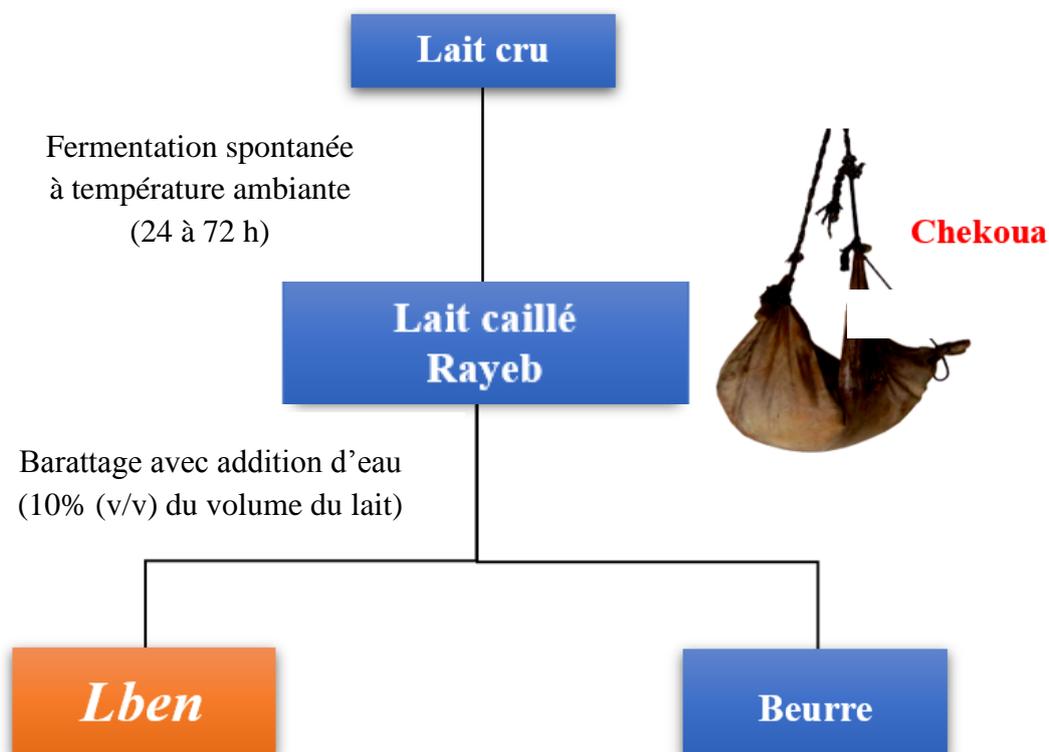


Figure 02. Procédé de fabrication des laits fermentés traditionnels algériens (*Lben* et *Rayeb*) (adaptée de Benkerroum et Tamime, 2004)

Les caractéristiques organoleptiques particulières allant de l'onctuosité du *rayeb* à la fraîcheur, et aux arômes agréables du *lben* sont liées à la microflore autochtone du lait principalement et aux conditions de l'environnement. La microflore lactique, généralement prédominante dans ces produits, est essentiellement constituée d'espèces de *Leuconostoc* et de *Lactococcus* initiant la fermentation. Certaines espèces de *Lactobacillus* et de levures peuvent également participer au processus de fermentation, notamment par le développement des arômes (Hamama et Bayi, 1991 ; Bendimerad *et al.*, 2012 ; Hamoudi-Belarbi *et al.*, 2016 ; Ghalouni *et al.*, 2018). A rappeler que des espèces thermophiles telle que *Streptococcus thermophilus* dominant la fermentation de certains laits fermentés traditionnels *laban khad* d'Egypte ou *labaneh* de Liban (Benkerroum *et al.*, 2013).

Les bactéries lactiques sont à l'origine de la fermentation du lait par transformation du lactose en acide lactique, précipitation des caséines et coagulation du lait ainsi que du développement de composés aromatiques volatils tels que le diacétyl et l'acétaldéhyde. La composition physico-chimique de ces produits, qui est présentée dans le tableau 01, n'est pas constante d'une région à l'autre, elle dépend de la composition du lait, qui varie avec l'espèce, la saison de lactation et l'alimentation, ainsi que des conditions de fabrication (Benkerroum et Tamime, 2004 ; Salameh *et al.*, 2016).

Tableau 01: Composition chimique moyenne du *lben* traditionnel algérien (Zitoun *et al.*, 2011)

Paramètre	valeur
Matière sèche (g/100 g)	9,06
Matière grasse (g/100 g)	0,91
Protéines (g/100 g)	4,4
Chlorure (g/100 g)	0,19
Acidité titrable (°D)	84
pH	4,84

°D : degré dornic

4. Lait fermentés traditionnels : des produits nourrissants au service de l'homme

Au-delà de l'intérêt nutritionnel des laits fermentés traditionnels de par leur richesse en nutriments essentiels à l'entretien et au fonctionnement de l'organisme, des vertus liées à la santé (parfois thérapeutiques) leur sont attribuées. En effet, les laits fermentés notamment traditionnels sont une source de microorganismes diversifiés aux effets positifs sur la santé (Hill *et al.*, 2017 ;

Ghosh *et al.*, 2019). Ces microorganismes peuvent produire des substances à activité biologique tels que les acides organiques, ou les peptides à activités antimicrobienne, anxiolytique et autres activités biologiques, intervenant dans la prévention de certaines maladies (Ebringer *et al.*, 2008 ; Benkerroum *et al.*, 2013 ; Verruck *et al.*, 2019).

Il est à souligner que la découverte de ces produits, à des buts de conservation, était marquée par des utilisations thérapeutiques. Selon la tradition perse, la recette de préparation du yaourt a été révélée à Abraham par un ange, et à cette nourriture il devait sa fécondité et sa longévité (Rosell, 1932). Des écrits remontant à 700 ans (EC) parlent également d'une tribu au Japon qui considérait le lait et les produits laitiers, introduits au Japon par les Chinois, comme des médicaments et des produits de luxe, réservés aux enfants, aux vieux et aux malades (Redlingshöfer et Soyeux, 2010). De même, le *kéfir* et le *dahi* étaient utilisés comme agents thérapeutiques chez des peuples du Caucase et de l'Inde (Pernoud *et al.*, 2005 ; Slattery *et al.*, 2019). Le symbole de longévité était également attribué aux laits fermentés par plusieurs civilisations à travers les âges (Pernoud *et al.*, 2005 ; Bourlioux, 2007).

Plus tard des scientifiques se sont succédés pour mettre en exergue le lien entre laits fermentés (à travers les microorganismes contenus dans ces produits) et effets positifs sur la santé tels que le rétablissement de l'équilibre du microbiote intestinal après un traitement d'antibiotiques, ou encore la diminution du risque de survenue de diabète de type II (Beausoleil *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2014 ; Verruck *et al.*, 2019). En effet, la consommation de kéfir est associée à de nombreux effets bénéfiques pour la santé à savoir anti-inflammatoires, anti-cancérogènes, anti-oxydants, hypocholestérolémiants, réduction de l'hypertension et amélioration de la digestion et de la santé intestinale (Slattery *et al.*, 2019 ; Verruck *et al.*, 2019). A ce jour, le *Koumis* est utilisé en traitement avec les antibiotiques, et contre des maladies gastro-intestinales et infectieuses chez les populations kazakhs (Akhmetsadykova, 2012)

En outre, il est admis que les laits fermentés améliorent la digestibilité du lait par la conversion du lactose en acide lactique à travers les fermentations naturelles. D'ailleurs, ces fermentations avaient permis d'entretenir la culture du lait même chez des populations où les adultes toléraient mal le lactose du lait (Redlingshöfer et Soyeux, 2010). Des preuves actuelles y ont été apportées pour le yaourt et d'autres laits fermentés quant à l'amélioration de la digestion du lactose chez les personnes intolérantes au lactose (Savaiano, 2014 ; Pakdaman *et al.*, 2015).

1. Caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) représentent un groupe hétérogène de plusieurs genres appartenant, principalement, au phylum des *Firmicutes* et partageant une variété d'habitats. Elles colonisent les cavités humaines et animales (tractus gastro-intestinal, cavité buccale, voies respiratoires, *etc.*) ainsi qu'un certain nombre de niches environnementales tels que plantes, produits laitiers transformés, viande et légumes (König et Fröhlich, 2009 ; Sun *et al.*, 2014).

Ces bactéries sont à Gram positif et se présentent sous forme de coques ou de bâtonnets. Elles sont généralement immobiles, asporogènes, anaérobies mais aérotolérantes, dépourvues de catalase (une activité catalase hème-dépendante est exprimée pour quelques espèces), de cytochrome oxydase et de nitrate réductase. Leur faible capacité de biosynthèse les rend d'une exigence nutritionnelle particulière surtout en acides aminés, bases nucléiques, acides gras et vitamines (Vandamme *et al.*, 1996 ; Holzapfel *et al.*, 2001).

La principale caractéristique des BL est un métabolisme fermentaire produisant principalement de l'acide lactique à partir des glucides. Elles sont de ce fait, considérées homofermentaires si l'acide lactique est majoritairement produit (plus de 90%). En revanche, si des quantités significatives d'acide acétique, d'acide formique, d'éthanol, et de CO₂ sont formées outre l'acide lactique, les BL sont dites alors hétérofermentaires (Stiles et Holzapfel, 1997).

Les métabolites synthétisés au cours de la fermentation influencent les qualités organoleptique et sanitaire des produits ainsi fermentés. D'une part, l'acide lactique et les composés aromatiques contribuent à l'amélioration du goût de ces produits. D'autre part, l'acidification du milieu, due aux acides organiques, et à la production de substances bactéricides limitent la croissance des bactéries indésirables. Ces caractéristiques confèrent aux BL un rôle important en industrie agroalimentaire notamment en industrie laitière (Martinez *et al.*, 2013 ; Thierry *et al.*, 2015).

2. Principaux genres de bactéries lactiques

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène du point de vue taxonomique en dépit des caractéristiques physiologiques et métaboliques communes aux membres de ce groupe (Sun *et al.*, 2014).

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen en 1919, les BL étaient constituées de quatre genres : *Lactobacillus* (*Lb.*), *Leuconostoc* (*Le.*), *Pediococcus* (*P.*) et *Streptococcus* (*S.*) (Von Wright et Axelsson, 2012). Depuis, plusieurs classifications ont été proposées sur la base des propriétés morphologiques, physiologiques, biochimiques ou encore métaboliques (Holzapfel *et al.*, 2001). Par la suite, les approches moléculaires, basées essentiellement sur l'analyse des séquences de l'ARN

ribosomique 16S, ont permis d'inclure dans la taxonomie des BL de nouveaux genres et espèces (Mohania *et al.*, 2008 ; Von Wright et Axelsson, 2012).

Actuellement, il est admis que les BL appartiennent au phylum des *Firmicutes*, de la classe des *Bacilli* et de l'ordre des *Lactobacillales*, à l'exception des bifidobactéries qui dépendent du phylum des *Actinobacteria* (Mattarelli *et al.*, 2014 ; Felis *et al.*, 2015).

Selon le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, les BL de l'ordre des *Lactobacillales*, sont regroupées dans six familles : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, et *Streptococcaceae* (Vos *et al.*, 2009) (tableau 02). Elles sont caractérisées par un faible contenu en guanine et cytosine (GC de 31 à 49%) alors qu'il est plus élevé pour les *Bifidobacteriaceae*, allant de 50 à 67% pour le genre *Bifidobacterium* (*B.*) (Von Wright et Axelsson, 2012 ; Mattarelli *et al.*, 2014 ; Sun *et al.*, 2014 ; Felis *et al.*, 2016).

Il est à rappeler que cette caractéristique ainsi que leur appartenance à un autre phylum, éloignent les espèces du genre *Bifidobacterium* des autres BL. Elles sont toutefois considérées comme telles (BL) au vu des caractéristiques physiologiques et biochimiques ainsi que des niches écologiques partagées par les membres de ce groupe (Liu *et al.*, 2014 ; Sun *et al.*, 2014).

Tableau 02. Familles et genres de bactéries lactiques (Vos *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2014 ; Mattarelli *et al.*, 2014 ; Sun *et al.*, 2014 ; Felis *et al.*, 2015)

Famille	Genres
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Abiotrophia</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Dolosicoccus</i> , <i>Eremococcus</i> , <i>Facklamia</i> , <i>Globicatella</i> , <i>Ignavigranum</i>
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Agitococcus</i> , <i>Alkalibacterium</i> , <i>Allofustis</i> , <i>Alloiococcus</i> , <i>Atopobacter</i> , <i>Atopococcus</i> , <i>Atopostipes</i> , <i>Carnobacterium</i> , <i>Desemzia</i> , <i>Dolosigranulum</i> , <i>Granulicatella</i> , <i>Isobaculum</i> , <i>Lacticigenium</i> , <i>Marinilactibacillus</i> , <i>Pisciglobus</i> , <i>Trichococcus</i>
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Bavariicoccus</i> , <i>Catelicoccus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Melissococcus</i> , <i>Pilibacter</i> , <i>Tetragenococcus</i> , <i>Vagococcus</i>
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Sharpea</i>
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i> , <i>Fructobacillus</i> , <i>Oenococcus</i> , <i>Weissella</i>
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i> , <i>Lactovum</i> , <i>Streptococcus</i>
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Aeriscardovia</i> , <i>Alloiscardovia</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Metiscardovia</i> , <i>Parascardovia</i> , <i>Scardovia</i>

3. Streptocoques

Le terme « *Streptococcus* » provient du grec *streptos* qui signifie tordu en forme de chaîne et *kokkos* qui veut dire graine. Il a été employé pour la première fois par Rosenbach en 1884 pour désigner l'espèce *S. pyogenes*, isolée de lésions suppuratives chez l'homme.

Le genre *Streptococcus* appartient à la famille des *Streptococcaceae* de l'ordre des *Lactobacillales*, il regroupe des espèces dont les cellules se présentent en forme de coques s'organisant en chaînettes (Hardie et Whiley, 1997 ; Sun *et al.*, 2014). Ces espèces sont toutes homofermentaires, produisant de l'acide lactique L, à coloration Gram positive, anaérobie facultative, et dépourvues de catalase, de cytochrome oxydase et de nitrate réductase. Un faible contenu en GC (31 à 49%) caractérise les streptocoques (Tagg *et al.*, 2012) et dont la taille des génomes est comprise entre 1,8 et 2,39 Mpb environ (Sun *et al.*, 2014). La paroi cellulaire est composée de peptidoglycane (muréine) ainsi que de divers polysaccharides associés. Cette structure se décline en différents types distinguant les espèces entre elles (Hardie et Whiley, 1997).

La première classification des streptocoques était basée sur des critères structuraux et biochimiques, principalement sur leur équipement antigénique ou leur pouvoir hémolytique (Hardie et Whiley, 1997). En effet, décrits vers la fin du XIX^e siècle par Billroth (1874), Pasteur (1879), puis Rosenbach (1884), les streptocoques ont connu de nombreuses classifications (Tagg *et al.*, 2012). Parmi les plus importantes d'entre elles, figurent celle de Lancefield (1933) suggérant 6 groupes de streptocoques ; suivie par la classification de Sherman (1937) qui propose quatre groupes : streptocoques lactiques, viridans, pyogenes et *Enterococcus* (Facklam, 2002). En 1978, Jones a remplacé dans la classification de Sherman les streptocoques viridans par les streptocoques oraux, les entérocoques par les streptocoques fécaux et a rajouté les pneumocoques (Hardie et Whiley, 1997 ; 2012 ; De Vuyst et Tsakalidou, 2008).

Au milieu des années 80, l'avènement des techniques de la biologie moléculaire a révolutionné la taxonomie bactérienne. En effet, le genre *Streptococcus* a éclaté en trois genres génétiquement distincts : *Streptococcus sensu stricto* qui comprend la majorité des espèces connues, *Enterococcus* (*E.*) et *Lactococcus* (*L.*) (Schleifer et Kilpper-Balz, 1987). De nouvelles études phylogénétiques ont permis d'affiner la taxonomie du genre qui est loin d'être définitive. Les streptocoques sont divisés en 7 groupes : Mitis, Anginosus, Mutans, Salivarius, Bovis/Equinus, Pyogene, et un groupe constitué d'espèces non classées (*S. suis*, *S. acidiminimus*, et *S. pleomorphus*) (Hardie et Whiley, 1997 ; Tagg *et al.*, 2012 ; Sun *et al.*, 2014).

Les cinq premiers groupes formant la division Viridans qui, à l'exception de *S. thermophilus*, comprend des espèces commensales à pathogènes des muqueuses du tube digestif ou de la cavité

orale de l'homme et des animaux (Kawamura *et al.*, 1995 ; Tagg *et al.*, 2012). Au sein de cette division, seule l'espèce *S. thermophilus* du groupe Salivarius est reconnue GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Actuellement, une autre espèce du complexe Bovis/Equinus possède le statut « *food grade* ». Il s'agit de *Streptococcus macedonicus* qui est très souvent isolée de produits laitiers traditionnels (De Vuyst et Tsakalidou, 2008). Par cette distinction au sein du genre *Streptococcus*, ces deux espèces offrent des opportunités d'applications avérées dans le domaine alimentaire. Elles seront par conséquent documentées dans ce travail.

3.1. *Streptococcus thermophilus* : une espèce qui a fait ses preuves

L'une des spécificités de *S. thermophilus* réside dans le fait que c'est le seul streptocoque qui porte la mention GRAS, et donc reconnue officiellement comme étant une espèce non pathogène (FDA, 2002 ; 2012). Ce statut lui a valu une large utilisation dans les domaines alimentaires et pharmaceutique.

Pendant longtemps, l'espèce a été considérée faiblement variable et peu protéolytique (Shahbal *et al.*, 1991), jusqu'au moment où plusieurs souches telles que *S. thermophilus* LMD-9 et *S. thermophilus* CNRZ385 qui expriment une activité protéolytique de surface (Galia *et al.*, 2009 ; Delorme *et al.*, 2010) aient été décrites. Cette propriété a renforcé son emploi dans la fabrication de produits laitiers. Elle est d'ailleurs appliquée dans la fabrication du yaourt en co-culture avec *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*). Cette espèce est de ce fait l'une des deux bactéries faisant partie de la définition officielle du yaourt selon le *Codex Alimentarius*.

Outre son utilisation en industrie laitière, *S. thermophilus* est reconnue également pour ses propriétés probiotiques. Une allégation santé a d'ailleurs été délivrée, par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) en 2010, pour le yaourt concernant la digestion du lactose chez les patients intolérants à ce glucide. D'autres propriétés probiotiques ont été mises en évidence pour *S. thermophilus* et qui pourraient être exploitées au service de l'homme.

3.1.1. Place de *Streptococcus thermophilus* dans le genre *Streptococcus*

S. thermophilus appartient au groupe Salivarius de la division Viridans. Ce groupe comprend deux autres espèces de streptocoques oraux : *S. vestibularis* et *S. salivarius* (Facklam, 2002 ; Hols *et al.*, 2005). Pendant longtemps, *S. thermophilus* était considérée comme une sous-espèce de *S. salivarius* (Farrow et Collins, 1984). L'analyse par hybridation ADN-ADN ainsi que des séquences des gènes de l'ARNr 16S et *sodA* ont indiqué une proximité de *S. thermophilus* aux espèces *S. vestibularis* et *S. salivarius* (Schleifer *et al.*, 1991 ; Kawamura *et al.*, 1995 ; Poyart *et al.*,

1998 ; Hols *et al.*, 2005). Plus tard, le séquençage de plusieurs gènes de ménage (*ddlA*, *pepO*, *glcK*, *ilvC*, *serB*, etc.) ont permis de confirmer ce lien tout en affirmant que les espèces *S. salivarius* et *S. thermophilus* étaient génétiquement séparées (Delorme *et al.*, 2007 ; Delorme *et al.*, 2015). De ce fait, *S. thermophilus* est actuellement considérée comme une espèce distincte du groupe *Salivarius* même si la dénomination *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* est encore employée quelque fois dans la littérature (Burton *et al.*, 2017).

3.1.2. Adaptation de *Streptococcus thermophilus* à sa niche écologique : le lait

Etant capable de produire de l'acide lactique à partir du lactose, *S. thermophilus* aurait été utilisée depuis les premières transformations de lait il y a 10 000 ans (Bolotin *et al.*, 2004), elle l'est encore aujourd'hui dans les fermentations de produits laitiers. Cette espèce semble donc avoir élu le lait comme niche écologique surtout que de nombreuses souches y ont été isolées (Burton *et al.*, 2017).

L'investissement de cet environnement depuis la fabrication des produits laitiers aurait alors permis à *S. thermophilus* d'y évoluer par la perte de gènes de virulence et l'acquisition de nouvelles fonctions : protéase de surface, biosynthèse de bactériocine et d'exopolysaccharides (EPS) (Uriot *et al.*, 2017). Elle a perdu environ 10% de ses gènes, ce qui s'est traduit soit, par leur absence des génomes, soit par leur inactivation (pseudogènes). Ces pseudogènes sont essentiellement relatifs au métabolisme énergétique (régulation, transport), aux phages et aux facteurs de virulence (Bolotin *et al.*, 2004 ; Morelli *et al.*, 2012). La faible variabilité entre les souches de *S. thermophilus* par rapport à celle de *S. salivarius* indique par ailleurs, qu'il s'agit d'une espèce qui a récemment émergé (Delorme *et al.*, 2007 ; Delorme *et al.*, 2010).

La comparaison des génomes de six souches de *S. thermophilus* (CNRZ1066, LMG18311, LMD-9, ND03, JIM8232, M17PTZA496) (Bolotin *et al.*, 2004 ; Delorme *et al.*, 2011 ; Makarova *et al.*, 2006 ; Sun *et al.*, 2011 ; Vendramin *et al.*, 2017) disponibles dans les bases de données EMBL/GenBank suggère que leur chromosome est circulaire, d'une taille comprise entre 1,8 et 1,9 Mpb et peut atteindre une taille de 2,15 Mpb pour celui de la souche *S. thermophilus* M17PTZA496. Il est caractérisé par un faible pourcentage en GC (39%). Seule la souche LMD-9 héberge deux plasmides à faible nombre de copies (Jameh, 2012).

De nombreux gènes de virulence liés aux streptocoques pathogènes sont absents des génomes de *S. thermophilus* comme c'est le cas pour les gènes de résistance aux antibiotiques (Bolotin *et al.*, 2004 ; Sun *et al.*, 2011 ; Vendramin *et al.*, 2017 ; Hatmaker *et al.*, 2018). En revanche, un gène codant la protéase de paroi PrtS (homologue aux gènes de virulence liés à la paroi chez les

streptocoques pathogènes), nécessaire à la croissance de *S. thermophilus* par hydrolyse des caséines en peptides et en acides aminés, a été retrouvé chez la souche *S. thermophilus* LMD-9 (Galia *et al.*, 2009 ; Delorme *et al.*, 2010).

Finalement, il semblerait aussi que *S. thermophilus* se soit adaptée au lait par l'acquisition de nouveaux gènes, voire de nouvelles fonctions. Cela a été possible par transfert génétique horizontal (TGH) entre cette espèce et celles partageant le même environnement quand bien même ces espèces seraient relativement éloignées d'un point de vue phylogénétique (Bolotin *et al.*, 2004 ; Rasmussen *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2013). Le gène *PrtS*, par exemple, aurait été acquis par TGH de *S. suis* (Delorme *et al.*, 2010). Alors que le gène *metC*, impliqué dans la synthèse de la méthionine chez *Lb. bulgaricus* a été retrouvé dans le génome de *S. thermophilus* (Bolotin *et al.*, 2004). De même qu'un groupe de gènes nécessaires à la production d'EPS lui a été transféré de *Lactobacillus* (Liu *et al.*, 2009). L'acquisition de ces gènes a finalement contribué à l'adaptation de *S. thermophilus* au lait.

3.1.3. Principales caractéristiques de *Streptococcus thermophilus*

S. thermophilus est un coque lactique thermophile qui croît de façon optimale à 42°C ; il s'agit d'une espèce anaérobie aérotoleante pouvant croître en présence de faibles quantités d'oxygène. Toutefois elle est incapable de dégrader l'esculine et de se développer à pH 9,6 ou à une concentration élevée en sel (6,5%, p/v) (Hardie et Whiley, 1997 ; Uriot *et al.*, 2017).

S. thermophilus est exigeante d'un point de vue nutritionnel, elle requiert pour sa croissance des sources carbonées fermentescibles, azotées, phosphatées, etc. (Pastink *et al.*, 2009).

C'est une espèce homofermentaire qui convertit préférentiellement le lactose, source carbonée du lait, en acide lactique. Dotée d'un transporteur de lactose (*lacS*) et d'une β -galactosidase (*lacZ*), *S. thermophilus* s'est spécialisée dans la dégradation du lactose. Elle a cependant une capacité, en général, limitée à dégrader certains autres glucides et une incapacité à métaboliser le galactose, issu de la dégradation du lactose, et qui est expulsé dans le milieu extérieur (Iyer *et al.*, 2010b). Dans les génomes d'une dizaine de souches de *S. thermophilus*, les gènes codant le système de transport PTS (*PhosphoTransferase System*) de certains glucides sont inactivés telle que *fruA* (fructose) (Bolotin *et al.*, 2004). En revanche, la difficulté à métaboliser le galactose est plutôt imputée à une faible activité de la galactokinase (*GalK*) et de l'aldose 1-épimérase (*GalM*). Ces deux enzymes en plus de deux autres (*GalT* et *GalE*) relatives au catabolisme du galactose existent chez *S. thermophilus* comme opéron *galKTEM* (Vaillancourt *et al.*, 2004 ; 2008).

Pour leur croissance, les BL dont *S. thermophilus* requièrent une source azotée. Parmi les sources azotées du lait, les BL peuvent utiliser les acides aminés libres, les peptides ou les protéines (après dégradation par leurs protéases de surface). Or, la teneur en acides aminés libres et en petits peptides dans le lait est insuffisante pour une croissance optimale de ces bactéries qui en sont dépendants. *S. thermophilus* qui est auxotrophe pour quatre acides aminés environ est de ce fait moins exigeante que *Lb. bulgaricus* ou *L. lactis* (Letort et Juillard, 2001 ; Pastink *et al.*, 2009 ; Iyer *et al.*, 2010b).

La croissance de *S. thermophilus* dans le lait est donc conditionnée par sa capacité à synthétiser et à consommer des acides aminés issus d'autres espèces symbiotiques ou à utiliser les protéines du lait. La capacité de biosynthèse des acides aminés chez *S. thermophilus* est supérieure à celle de *Lb. bulgaricus* mais elle reste très variable selon les souches. La plupart des gènes nécessaires à la synthèse de l'histidine sont présents dans le génome de la souche *S. thermophilus* LMD-9 alors qu'un seul est retrouvé dans ceux des souches *S. thermophilus* CNRZ1066 et *S. thermophilus* LMG1831. Ces deux derniers génomes sont également dépourvus de gènes nécessaires à la biosynthèse de la lysine, de l'alanine et des acides aminés soufrés (Hols *et al.*, 2005). En revanche, selon Garault *et al.* (2000), *S. thermophilus* possède des voies de biosynthèse d'acides aminés à chaîne ramifiée fonctionnelles et essentielles à sa croissance en lait ; il s'agit d'isoleucine, de leucine et de valine. Ce caractère est conservé pour cette espèce et semble être lié à son adaptation au lait en absence de protéase de paroi.

En outre, cette espèce est capable de se développer en lait par l'utilisation d'acides aminés que libèrent d'autres espèces protéolytiques évoluant en symbiose dans le même milieu. L'exemple le plus connu est celui du yaourt où *S. thermophilus* croît de façon optimale en co-culture avec *Lb. bulgaricus*. Cette espèce dégrade les lactoprotéines (caséines) en acides aminés et petits peptides nécessaires à la croissance de *S. thermophilus* en lait. En contre partie, celle-ci produit du CO₂, et des métabolites tels que l'acide formique, l'ornithine, la putrescine, et les folates permettant de stimuler la croissance de *Lb. bulgaricus*. Cette relation symbiotique entre les espèces est très intéressante en industrie puisqu'elle réduit le temps de fermentation, accroît la production de composés aromatiques et améliore la stabilité du produit. Elle est surtout exploitée pour des souches dépourvues d'une forte activité protéolytique (Herve-Jimenez *et al.*, 2008 ; Sasaki *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2016).

L'autre stratégie adoptée par les BL pour croître en lait est l'utilisation des lactoprotéines. Pour cela, une hydrolyse extracellulaire des protéines par une protéase de paroi doit être réalisée. Les peptides générés sont ensuite internalisés par des systèmes de transport oligo, di-, et tri- peptides à

l'intérieur de la cellule pour être dégradés par des peptidases intracellulaires en acides aminés (Hols *et al.*, 2005 ; Kowalczyk *et al.*, 2015 ; Rodriguez-Serrano *et al.*, 2018). De nombreuses souches de *S. thermophilus* ne possèdent pas de protéase extracellulaire. D'ailleurs, pendant longtemps, cette espèce a été considérée peu protéolytique. Toutefois, de plus en plus d'études démontrent une émergence du gène *prtS* codant l'enzyme PrtS dans les collections de souches de *S. thermophilus* (Rasmussen *et al.*, 2008 ; Galia *et al.*, 2009 ; Delorme *et al.*, 2010 ; Brasca *et al.*, 2016). La souche *S. thermophilus* LMD-9 dispose d'une protéase de paroi appelée PrtS, appartenant à la sous-famille de protéases à serine de la famille des subtilisines. PrtS est liée de façon covalente au peptidoglycane via le motif LPxTG reconnu par la sortase A (SrtA) chez les bactéries à Gram positif (Fernandez-Espla *et al.*, 2000 ; Chang *et al.*, 2012).

La vitesse de croissance en lait diffère d'une souche à l'autre chez *S. thermophilus*, ce qui implique une variabilité au niveau de la protéase de paroi (Shahbal *et al.*, 1991). Cette variabilité pourrait résulter d'un défaut de maturation ou de régulation de la protéase (Galia *et al.*, 2009 ; 2016). Dans les travaux de Galia *et al.* (2009), le séquençage du gène *prtS* de 4 souches n'exprimant pas d'activité prtS et d'une souche protéolytique (PrtS+) a révélé un seul allèle correspondant à celui de la souche *S. thermophilus* LMD-9. De même, la séquence protéique de la protéase de cette souche présentait une identité de 95,9% avec celle de *S. suis*. La principale différence est une duplication imparfaite dans les séquences codantes chez la souche *S. thermophilus* LMD-9 qui n'est pas retrouvée chez *S. suis*.

Les peptides issus de l'hydrolyse des caséines sont ensuite acheminés à l'intérieur de la cellule de *S. thermophilus* par trois systèmes de transport DtpT (di/tripeptide transporteur), Ami et Ots (Jameh *et al.*, 2016). Le premier système, constitué de cinq protéines associées à la membrane cellulaire, assure le transport de divers di- et tri- peptides par hydrolyse de l'ATP et la formation de NAD⁺. Le second système de transport (Ami) est un transporteur d'oligopeptides qui présente une forte homologie avec celui de *S. pneumoniae*. Il s'agit d'un transporteur ABC « ATP Binding Cassette » composé de protéines transmembranaires (AmiC et AmiD), ces dernières sont associées aux ATPases : AmiE et AmiF assurant le transport par hydrolyse de l'ATP (Chang, 2011, Rodriguez-Serrano *et al.*, 2018). L'autre transporteur d'oligopeptides est le système Ots qui est de type ABC peptide/nickel, composé de OtsA (*peptide/nickel binding proteins*), de deux perméases ainsi que d'une double ATPase OtsD (Jameh *et al.*, 2016).

Les peptidases intracellulaires s'attaquent aux peptides internalisés pour libérer des petits peptides et des acides aminés. Chez *S. thermophilus*, des peptidases extracellulaires ont été identifiées en l'occurrence une peptidase (X-prolyl dipeptidyl peptidase) ancrée dans la paroi (Hafeez *et al.*,

2013 ; 2015) ainsi que des activités oligoendopeptidasiques (PepO, PepEP et PepF), aminopeptidasiques (AP1, PepC, PepN, PepA), peptidasiques spécifiques pour le résidu proline (prolidase, prolinase, PepP et PepS), et di-tripeptidasiques (DP1, DP2, TP1 et TP2) (Chang, 2011 ; Kowalczyk *et al.*, 2015).

L'existence de peptidases extracellulaires chez *S. thermophilus* notamment les souches de phénotype PrtS⁻ pourrait jouer un rôle dans l'utilisation de la caséine afin de générer des acides aminés, essentiels à leur croissance (Hafeez *et al.*, 2015). Les acides aminés libérés sont soit utilisés pour la synthèse protéique soit catabolisés à des fins énergétiques en conditions nutritionnelles limitées. Ce catabolisme s'accompagne de la production de composés aromatiques, tels que l'acétaldéhyde issu de l'activité thréonine aldolase, ainsi que de précurseurs de biosynthèse de bases nucléiques et de vitamines (Chaves *et al.*, 2002, Iyer *et al.*, 2010b). En effet, certaines enzymes impliquées dans la dégradation des acides aminés par transamination ont été retrouvées dans les génomes de *S. thermophilus* en l'occurrence l'aminotransférase à chaîne ramifiée (BcAT), la glutamate déshydrogénase (GDH), l'alcool déshydrogénase (AlcDH,) l'estérase A (EstA) ou encore le complexe céto-déshydrogénase (Cui *et al.*, 2016).

D'un autre coté, *S. thermophilus* exprime une activité uréasique transformant l'urée en ammoniacque et en CO₂. L'effet tampon de l'ammoniacque dans le milieu entraîne une augmentation de l'activité cellulaire et par conséquent une production très élevée de l'acide lactique. Ceci peut engendrer des défauts de fabrication des produits fermentés (Mora *et al.*, 2004 ; Monnet *et al.*, 2005 ; Galia *et al.*, 2009 ; Iyer *et al.*, 2010b). Les gènes responsables de cette activité ont été identifiés dans le cluster *ureIABCDEFGMQO* (Mora *et al.*, 2004).

3.1.4. Intérêt technologique de *Streptococcus thermophilus*

S. thermophilus est actuellement l'une des bactéries les plus consommées dans les produits fermentés, étant présente dans les millions de tonnes de yaourt et de fromages produits chaque année (Burton *et al.*, 2017). Elle est employée le plus souvent en combinaison avec d'autres microorganismes dans les laits fermentés, les yaourts et les fromages types : Emmental, Parmesan, Cheddar, Mozzarella (Parente et Cogan, 2004 ; Awad *et al.*, 2005).

Le rôle principal de *S. thermophilus* en industrie laitière est la fermentation du lait par la conversion du lactose en acide lactique entraînant la diminution rapide du pH. Cette acidification du milieu engendre la précipitation des caséines assurant ainsi la coagulation du lait. L'utilisation de *S. thermophilus* en industrie laitière n'est pas uniquement liée à sa fonction acidifiante, des propriétés aromatisantes et texturantes lui sont également attribuées. En effet, cette espèce est

connue pour sa production d'acétaldéhyde, un arôme recherché dans les produits laitiers fermentés (Chaves *et al.*, 2002 ; Pastink *et al.*, 2009). En outre, des souches de *S. thermophilus* sont capables de synthétiser des EPS qui confèrent une texture filante au produit fini (De Vuyst *et al.*, 2001 ; Mende *et al.*, 2012 ; Pachekrepapol *et al.*, 2017). Il a été rapporté que les EPS de *S. thermophilus* pouvaient être utilisés en industrie alimentaire comme agents stabilisants, émulsifiants et gélifiants (Freitas *et al.*, 2011 ; Cui *et al.*, 2016). La production de bactériocines (thermophiline) a également été mise en évidence pour un bon nombre de souches. Plusieurs thermophilines ont été identifiées, elles ont le pouvoir d'inhiber des microorganismes pathogènes à Gram positif permettant ainsi d'assurer une bonne conservation des produits fermentés (Ivanova *et al.*, 1998 ; Rossi *et al.*, 2013 ; Renye *et al.*, 2016).

3.1.5. Intérêt probiotique de *Streptococcus thermophilus*

S. thermophilus est le streptocoque le plus utilisé en industrie laitière non seulement pour ses propriétés technologiques mais aussi pour ses effets positifs sur la santé. Son utilisation en tant que probiotique en industrie alimentaire et pharmaceutique est d'autant plus justifiée que son innocuité n'est plus à démontrer. Il dispose de la mention QPS (*Qualified Presumption of Safety*) par l'Europe (EFSA, 2007 ; 2018) et GRAS (*Generally Recognized As Safe*) par les Etats-Unis d'Amérique (FDA, 2002 ; 2012).

Parmi les effets probiotiques les plus prouvés de *S. thermophilus*, il y a la réduction de l'intolérance au lactose. Le lactose contenu dans le lait est digéré dans l'intestin grêle par la lactase (β -galactosidase). Le déficit en cette enzyme s'accompagne de désordres digestifs dus à l'accumulation du lactose dans l'intestin. L'efficacité de *S. thermophilus* chez des sujets déficients en lactase a été démontrée à travers plusieurs études (Marteau *et al.*, 1990 ; Rizkalla *et al.*, 2000 ; Savaiano, 2014). Celles-ci précisent que le yaourt contenant suffisamment de *S. thermophilus* et de *Lb. bulgaricus* augmente l'absorption du lactose chez ces patients ; une allégation santé lui a d'ailleurs été accordée par l'EFSA (2010).

D'autres effets ont été rapportés, parmi lesquels la réponse anti-inflammatoire dans la prévention des gastrites chroniques. En effet, Rodríguez *et al.* (2009 ; 2010) ont démontré l'effet inhibiteur d'EPS produits par *S. thermophilus* sur un ulcère chez des souris. Cet EPS avait un effet similaire à celui de l'oméprazole sur les gastrites. L'effet protecteur de certaines souches de *S. thermophilus* et/ou de leurs EPS contre *Helicobacter pylori* et la colite aiguë ont été rapportés par Marcial *et al.* (2017) et Chen *et al.* (2019). Cet effet est lié à l'adhésion aux muqueuses gastriques, la modulation des réponses inflammatoires et l'amélioration de la fonction de barrière muqueuse.

L'effet de *S. thermophilus* dans la prévention des diarrhées aiguës chez l'enfant a été suggéré depuis Metchnikoff en 1901. Des études ont montré l'effet positif de l'emploi de cette espèce, en combinaison avec d'autres bactéries probiotiques, sur l'incidence des diarrhées et la présence de rotavirus. Ce dernier étant le principal facteur responsable de diarrhée aiguë (Saavedra *et al.*, 1994 ; Canani *et al.*, 2007 ; Kort *et al.*, 2015).

L'effet antimicrobiens par la production de métabolites (acides organiques, bactériocines, etc.) empêcherait l'implantation de microorganismes indésirables dans le tractus gastro-intestinal (TGI). Un excellent effet antimicrobien de cette espèce contre les microorganismes pathogènes d'origine alimentaire et vaginale a été souligné par Evivie *et al.* (2017). Une réduction de la production de toxine a été également observée chez des souris infectées par *Clostridium difficile* puis traitées par des cellules vivantes de *S. thermophilus* (Kolling *et al.*, 2012). De même, la capacité de cette espèce présente dans le yaourt à stimuler le système immunitaire pour lutter contre les microorganismes pathogènes en induisant la production des Immunoglobulines A (IgA) sécrétées a été démontrée chez des souris infectées par Puri *et al.* (1996).

Par ailleurs, des souches de *S. thermophilus* sont capables de synthétiser l'acide folique. Il s'agit d'une vitamine du groupe B dont le déficit chez l'homme provoque des maladies cardiovasculaires et des anomalies du tube neural chez le nouveau-né (Iyer *et al.*, 2010a ; Laiño *et al.*, 2013 ; 2015 ; 2017). Par conséquent, l'apport d'acide folique par le biais de produits laitiers renfermant *S. thermophilus* permet de prévenir les carences nutritionnelles.

D'autres souches permettent de réduire le diabète, l'urémie et de produire de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) ainsi que des peptides bioactifs (Miclo *et al.*, 2012 ; Carafa *et al.*, 2019 ; Gao *et al.*, 2019 ; Kigerl *et al.*, 2019). Cette liste n'est pas exhaustive, d'autres effets bénéfiques sur la santé de *S. thermophilus* ont été rapportés.

3.2. *Streptococcus macedonicus* : une espèce en devenir

Si *S. thermophilus* est le seul membre du genre *Streptococcus* reconnu comme GRAS et largement utilisé en industrie alimentaire, un autre streptocoque peut prétendre à la même histoire. En effet, une seconde espèce a été isolée à partir d'un fromage grec, il s'agit de *S. macedonicus* (Tsakalidou *et al.*, 1998).

S. macedonicus ne possède pas encore la mention GRAS, mais son innocuité a été prouvée à travers des études *in vitro* et *in vivo*. A l'image de *S. thermophilus*, qui a une longue histoire dans la colonisation de l'environnement lait faisant de cette espèce ce qu'elle est aujourd'hui, *S. macedonicus* semble être prédestinée à un avenir prometteur en dépit de son appartenance

phylogénétique suggestive. A plus forte raison que des propriétés technologiques et même probiotiques lui ont été prêtées (De Vuyst et Tsakalidou, 2008 ; Treu *et al.*, 2017 ; Fusco *et al.*, 2019 ; Laiño *et al.*, 2015, 2019).

3.2.1. Positionnement de *Streptococcus macedonicus* au sein du genre *Streptococcus*

S. macedonicus fait partie de la division Viridans du genre *Streptococcus*, elle appartient au complexe *S. bovis* / *S. equinus*. Celui-ci est composé d'espèces rencontrées couramment dans la flore intestinale des herbivores. Ce sont des streptocoques du groupe D vu que l'antigène D, selon la classification de Lancefield, existe au niveau de leurs parois. La classification génétique du groupe D a été proposée dans un premier temps par Farrow et Collin (1984) qui ont reconnu six différents groupes dans le complexe *S. bovis* / *S. equinus*. Celui-ci a connu de nombreux remaniements taxonomiques au fil du temps.

Initialement, ce complexe était divisé en trois groupes sur la base d'une distinction phénotypique (Facklam, 1972) :

- Biotype I (fermentation du mannitol positive) ;
- Biotype II / 1 (fermentation du mannitol négative et glucuronidase négative) ;
- Biotype II / 2 (fermentation du mannitol négative et glucuronidase positive).

S. bovis et *S. equinus* étaient également considérées comme deux espèces distinctes sur la base des caractéristiques phénotypiques, de leur habitat et de leur caractère pathogène. Par la suite, plusieurs études moléculaires ont permis de conclure que *S. equinus* et *S. bovis* ne formaient qu'une seule espèce du complexe *S. bovis* / *S. equinus* et de revoir la nomenclature et la classification au sein du complexe, ainsi des sous-espèces ont été proposées (Farrow et Collin, 1984 ; Flackam, 2002 ; Schlegel *et al.*, 2003 ; Jans *et al.*, 2015) :

- *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (anciennement biotype I) ;
- *S. infantarius* subsp. *infantarius* et *S. infantarius* subsp. *coli* (biotype II / 1) ;
- *S. lutetiensis* (biotype II / 1) ;
- *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (biotype II / 2) ;
- *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* (biotype II / 2).

Cette taxonomie est actuellement utilisée mais fréquemment controversée, elle reste le siège de remaniements perpétuels au grès de l'évolution des techniques (Corredoria *et al.*, 2017). Ainsi, pour certains auteurs, *S. lutetiensis* et *S. infantarius* subsp. *coli* sont considérées comme synonymes (Hinse *et al.*, 2011 ; Dekker et Lau, 2016). De même, *S. bovis* et *S. equinus* qui formaient une même espèce ont été distinguées par Hinse *et al.* (2011).

S. macedonicus (ou *waius*) était d'abord considérée comme une espèce distincte au sein du complexe *S. bovis* / *S. equinus*, sur la base d'analyse des séquences des gènes de l'ARNr 16S et *sodA* (Tsakalidou *et al.*, 1998). En 2002, Poyart *et al.* ont proposé de regrouper les espèces *S. gallolyticus*, *S. macedonicus* et *S. waius* au sein d'une même espèce appelée *S. gallolyticus*. Or, cette proposition n'a pas fait l'unanimité dans la communauté scientifique. Ensuite, en 2003, Schlegel *et al.* ont considéré *S. macedonicus* comme une sous-espèce de *S. gallolyticus* qu'ils désignent sous le nom de *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* (figure 03). Cette nomenclature est encore utilisée bien que la taxonomie du complexe *S. bovis* / *S. equinus* ne soit pas largement acceptée. A plus forte raison que cette classification considère *S. macedonicus* au même titre que la sous espèce *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* supposée pathogène (Papadimitriou *et al.*, 2014). Le sous-comité du Comité International de Systématique des Procaryotes a d'ailleurs recommandé que *S. gallolyticus* devrait rester une espèce distincte (Georgalaki *et al.*, 2009 ; Papadimitriou, 2018). Actuellement, les deux nomenclatures sont adoptées dans la littérature, à savoir : *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* ainsi que *S. macedonicus* (Papadimitriou, 2018).

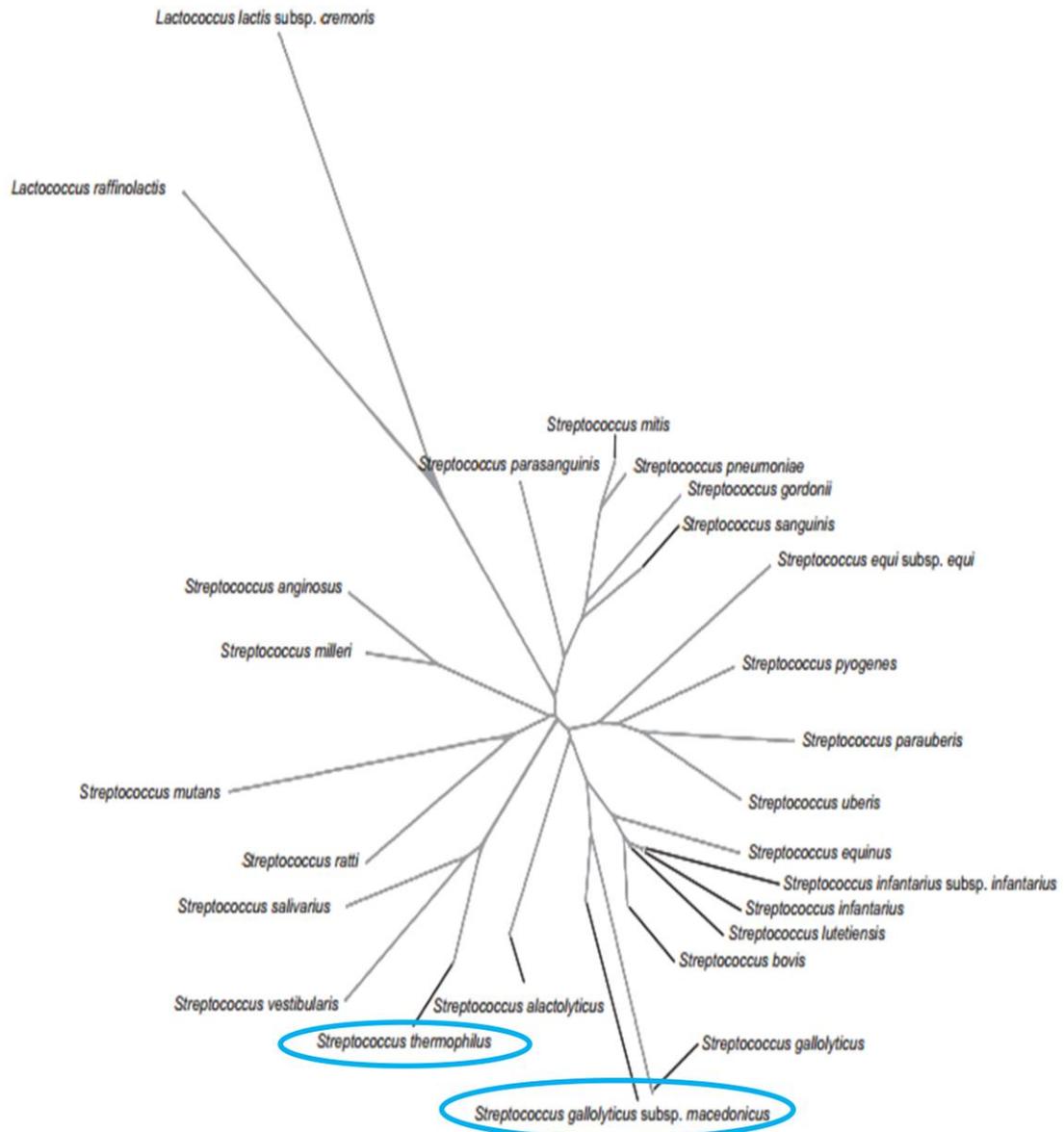


Figure 03. Dendrogramme représentatif de la position taxonomique de *S. macedonicus* (De Vuyst et Tsakalidou, 2008)

3.2.2. *Streptococcus macedonicus* : une espèce inoffensive au sein d'un groupe de streptocoques pathogènes

D'une manière générale, *S. macedonicus* est considérée comme un streptocoque lactique non-pathogène, possédant le statut « *food grade* » (De Vuyst et Tsakalidou, 2008 ; Maragkoudakis *et al.*, 2009).

Cette « non-pathogénie » a été dans un premier temps étayée par le fait de son caractère non hémolytique et sa sensibilité aux antibiotiques (Lombardi *et al.*, 2004 ; Zoumpoulou *et al.*, 2008).

Ces constatations ont été confirmées par Maragkoudakis *et al.* (2009), Tarrah *et al.* (2018b) et Laiño *et al.* (2019). D'ailleurs, l'absence de résistance aux antibiotiques est considérée comme une condition primordiale à la sélection de probiotiques par les organismes FAO/OMS ainsi que l'EFSA (Maragkoudakis *et al.*, 2009).

Ces derniers auteurs ont également exploré l'existence de gènes liés à la virulence de *S. pyogenes* chez la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198. Ensuite, celle-ci a été administrée par voie orale à des souris, de façon quotidienne (8,9 log UFC/g), durant 12 semaines afin de déterminer l'effet de sa consommation à long terme sur la santé de ces souris. Les résultats de cette étude ont révélé l'absence de gènes liés à la virulence de *S. pyogenes*. En outre, aucun effet indésirable relatif au comportement et au bien-être des souris n'a été observé. L'examen histologique n'a montré aucune inflammation au niveau de l'estomac. Aucun risque de translocation au foie, à la rate ou aux ganglions lymphatiques n'a été constaté. Ces résultats apportent ainsi la preuve de l'innocuité de *S. macedonicus* à travers la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198.

D'autres preuves ont été rapportées suite au séquençage du génome des souches *S. macedonicus* ACA-DC 198 et ACA-DC 679 (Papadimitriou *et al.*, 2012 ; Papadimitriou *et al.*, 2016). Effectivement, un nombre significatif de pseudogènes potentiels a été constaté dans le génome des deux souches. De nombreux gènes et facteurs de virulence semblent être perdus alors qu'ils sont hautement conservés chez *S. gallolyticus*. Pour exemple, les gènes nécessaires au catabolisme des glucides complexes d'origine végétale ainsi qu'à la détoxification de composés toxiques (tanins, acide gallique) du rumen sont absents du génome de *S. macedonicus*. Ce qui laisse à suggérer que *S. macedonicus* serait incapable de coloniser le tractus gastro-intestinal TGI des herbivores préférant le lait comme niche écologique. Aussi, des gènes de virulence tels que *pil1*, *pil2* impliqués dans l'adhésion de *S. gallolyticus* aux cellules et la colonisation de l'hôte sont inexistant chez *S. macedonicus* (Papadimitriou *et al.*, 2012 ; Papadimitriou *et al.*, 2014).

Par ailleurs, l'identification d'un opéron lactose propre à *S. macedonicus*, absent chez les autres espèces du complexe *S. bovis* / *S. equinus*, et d'un système protéolytique typique des BL conforte l'hypothèse d'une adaptation de l'espèce à l'environnement lait. De plus, la découverte du plasmide pSMA198 appartenant aux lactocoques pCI305/pWV02 suggère qu'il a été acquis par TGH du génome des lactocoques, qui partagent le même environnement que *S. macedonicus* (Papadimitriou *et al.*, 2015). Cependant, le fait que *S. macedonicus* appartienne au complexe *S. bovis* / *S. equinus*, qui comporte des espèces pathogènes, et qu'il soit associé à de rares cas d'endocardites (Benchetrit *et al.*, 2016), ne suffit pas à conclure de sa pathogénie.

En réalité, des espèces probiotiques reconnues GRAS ont été associées à des cas d'endocardites. *Lb. rhamnosus* en est l'exemple le plus frappant. Cette espèce a été isolée à différentes occasions de cas d'endocardites. Elle demeure toujours dans la liste de présomption d'innocuité reconnue (QPS) de l'EFSA en raison de la rareté de son incrimination et de sa longue histoire de souche inoffensive (Maragkoudakis *et al.*, 2009). *S. thermophilus* également aurait été identifiée dans un cas de bactériémie (Stephens et Turner, 2015) et dont certaines souches présenteraient une résistance à certains antibiotiques (Flórez et Mayo, 2017). Toutefois, l'EFSA n'en a pas tenu compte dans son rapport (2018) notamment pour preuves insuffisantes.

Au final, afin de prétendre au statut GRAS pour *S. macedonicus* à l'instar de *S. thermophilus*, de nouvelles preuves doivent être fournies notamment par le séquençage complet de souches d'origines différentes. Il faut noter qu'à ce jour, il n'existe qu'un seul génome complètement séquencé celui de la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 (Papadimitriou *et al.*, 2012) et six autres sous forme de contigs (Vendramin *et al.*, 2014 ; Papadimitriou *et al.*, 2016 ; Treu *et al.*, 2017).

3.2.3. Principales caractéristiques de *Streptococcus macedonicus*

Les premières souches de *S. macedonicus* ont été isolées en Macédoine, au nord de la Grèce, à partir de fromage Kasserli à pâte filée fabriqué avec du lait de brebis (Tsakalidou *et al.*, 1994). Plus tard, de nouvelles souches ont été isolées essentiellement à partir de fromages français (Callon *et al.*, 2004) et italiens (Lombardi *et al.*, 2004 ; Pacini *et al.*, 2006 ; Vendramin *et al.*, 2014 ; Treu *et al.*, 2017). D'autres souches ont été isolées de laits crus coréens (Cho *et al.*, 2010).

S. macedonicus est une bactérie à Gram positif, se présentant sous forme de coque en paires ou en chainettes et dépourvue de catalase. Elle est capable de croître à 37°C et à 42°C avec un optimum à 42,3°C pour la souche ACA-DC 198 (Tsakalidou *et al.*, 1998 ; Van den Berghe *et al.*, 2006 ; De Vuyst et Tsakalidou, 2008). Elle se distingue, du point de vue phénotypique, de *S. bovis* par son incapacité à dégrader l'esculine et de *S. thermophilus* par l'utilisation du maltose et du cellobiose. Elle est incapable de croître à 6,5% (p/v) de NaCl et à pH 9,6 (Tsakalidou, 1998).

L'analyse du génome de la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 a dévoilé un chromosome circulaire, d'une taille de 2,1 Mpb avec un faible taux en GC (37,6%). Il est ainsi plus petit que celui de *S. gallolyticus* d'environ 220 à 203 kb. Le pourcentage en pseudogènes potentiels est de 8,7% (contre 10% pour *S. thermophilus*). Par ailleurs, la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 héberge un plasmide pSMA198 ayant un haut pourcentage d'homologie avec ceux de *Lactococcus lactis* (pCI305/pWV02) (Papadimitriou *et al.*, 2014 ; 2015).

Ayant un métabolisme homofermentaire, *S. macedonicus* transforme le lactose du lait en acide lactique (Tsakalidou *et al.*, 1998 ; De Vuyst et Tsakalidou, 2008). En effet, l'analyse du génome de la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 a permis d'identifier un opéron lactose. Le groupe de gènes *lac* contient deux gènes de la 6-phospho- β -galactosidase (*lacG*). Cette souche se distingue des espèces du complexe *S. bovis/S. equinus* (SBSEC) par la présence du groupe de gènes *Lac* (SMA_1156 – SMA_1165) (Papadimitriou *et al.*, 2014 ; 2015).

Elle a également la capacité d'hydrolyser d'autres sucres tels que le fructose et le galactose. Par contre, elle est incapable d'utiliser l'inuline et le xylose (Tarrach *et al.*, 2018b).

S. macedonicus est une bactérie exigeante pour quelques acides aminés (Georgalaki *et al.*, 2000 ; Georgalaki *et al.*, 2002 ; Van den Berghe *et al.*, 2006). Elle est décrite en général dans la littérature comme faiblement acidifiante et peu protéolytique (Georgalaki *et al.*, 2000 ; Lombardi *et al.*, 2004). Effectivement, l'analyse du génome de la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 a permis d'identifier les gènes d'un système protéolytique (peptidases, système de transport) similaire à celui des BL, à l'exception du gène codant une éventuelle protéase de paroi, équivalent au *prtS* de *S. thermophilus* (Papadimitriou *et al.*, 2014). Cela n'exclut pas la possibilité d'émergence de souches protéolytiques tel que ça été le cas pour *S. thermophilus* (Galia *et al.*, 2009). D'ailleurs Cho *et al.* (2010) et Blaiotta *et al.* (2011) ont identifié des souches de *S. macedonicus* avec une activité protéolytique extracellulaire.

Quant à l'activité peptidasique, elle a été mise en évidence pour de nombreuses souches de *S. macedonicus*, essentiellement : X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase (PepX) (Georgalaki *et al.*, 2000) et arginyl-aminopeptidase (PepN) (Lombardi *et al.*, 2004). Cette espèce est également caractérisée par une faible décarboxylation de la tyramine et de l'ornithine et par conséquent une faible production d'amines biogènes (Georgalaki *et al.*, 2000 ; Blaiotta *et al.*, 2011).

D'autre part, *S. macedonicus* présente une activité lipolytique modérée envers la tributyrine qui a été signalée par Georgalaki *et al.* (2000) et confirmée par Blaiotta *et al.* (2011). Les souches de *S. macedonicus* étudiées exhibent également une activité estérasique. Concernant le citrate, certaines souches sont capables de l'utiliser (Georgalaki *et al.*, 2000).

Par ailleurs, les gènes codant la biosynthèse de vitamines, telles que la biotine (*bioBDY*), l'acide pantothénique (*panBCD*) et la riboflavine (*ribDEAH*), sont absents du génome de *S. macedonicus* ACA-DC 198. Cela conditionne un apport exogène en vitamines pour cette espèce, à l'image de *S. thermophilus* (Papadimitriou *et al.*, 2014).

3.2.4. Intérêts de *Streptococcus macedonicus*

S. macedonicus présente un intérêt technologique certain, vu qu'elle possède des activités recherchées dans la fabrication de produits laitiers fermentés telles que des activités lipolytique et peptidasique. Ces deux activités avec celle de l'utilisation de citrate justifient son application comme ferment complémentaire en co-cultures avec des cultures « starter » (Georgalaki *et al.*, 2000 ; Blaiotta *et al.* 2011 ; El Hatmi *et al.*, 2018 ; Fusco *et al.*, 2019).

En outre, en comparaison avec *S. thermophilus*, *S. macedonicus* est capable d'utiliser le lactose de façon optimale avec une plus courte phase de latence et un plus grand nombre de cellules en phase stationnaire. Elle serait le meilleur choix dans un éventuel contexte technologique d'un starter colonisant rapidement le milieu (Tarrach *et al.*, 2018b).

Concernant les EPS, *S. macedonicus* semble en être faiblement productrice. Peu de souches ont la capacité de produire ces molécules (Vincent *et al.*, 2001 ; Blaiotta *et al.*, 2011).

En revanche, *S. macedonicus* est dotée d'un pouvoir antimicrobien par la production de bactériocines contre les bactéries pathogènes et la flore indésirable. Ainsi, de nombreuses souches exhibent une activité antimicrobienne contre *Clostridium tyrobutyricum* et *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (Georgalaki *et al.*, 2002 ; Lombardi *et al.*, 2004 ; Pieterse *et al.*, 2008 ; Grazia *et al.*, 2017). La souche *S. macedonicus* ST91Km produit un lantibiotique appelé Macédocine ST91Km (2 à 2,5 kDa) actif contre plusieurs bactéries pathogènes dont *Streptococcus agalactiae* et *Staphylococcus aureus* (Pieterse *et al.*, 2008). Alors que la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 produit deux lantibiotiques nommés Macédocine (2,8 kDa) et Macédocicine (3,4 kDa), qui sont caractérisés par la forte inhibition de *Clostridium tyrobutyricum*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* et *Streptococcus gordonii* (Georgalaki *et al.*, 2002 ; Papadelli *et al.*, 2007 ; Georgalaki *et al.*, 2010 ; Georgalaki *et al.*, 2013 ; Zoumpopoulou *et al.*, 2013). Les génomes de *S. macedonicus* publiés révèlent effectivement des séquences liées aux bactériocines. Ils portent jusqu'à 10 gènes liés aux bactériocines et aux peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique. En revanche, seules quelques souches séquencées de *S. thermophilus* possèdent ces séquences liées aux bactériocines (Treu *et al.*, 2017).

Par ailleurs, une activité immunomodulatrice a été démontrée *in vitro* et *in vivo* pour la souche *S. macedonicus* LC743 à travers une forte activité sécrétoire de cytokines qui évoluent dans la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires (Cho *et al.*, 2010 ; 2012).

Une autre propriété intéressante a été mise en évidence pour *S. macedonicus*, est la biosynthèse de folates. En effet, Iaino *et al.* (2015) ont démontré que *S. macedonicus* en co-culture avec

S. thermophilus et *Lb. bulgaricus* conduisaient à un lait fermenté bio-enrichi en folates. Ce lait fermenté naturellement bio-enrichi permet l'amélioration du statut de folate et la prévention des carences. La souche *S. macedonicus* CRL 415 est de surcroît capable de produire des concentrations élevées en folates au cours de la fermentation du lait (Laiño *et al.*, 2019).

4. Identification des bactéries lactiques

L'identification et la différenciation des bactéries ont longtemps reposé sur l'étude d'un certain nombre de caractéristiques morphologiques, physiologiques, biochimiques, structurales de la cellule (Mohania *et al.*, 2008 ; Lahtinen *et al.*, 2012). Ensuite, cette identification a été élargie à l'étude du contenu de la cellule (matériel génomique ou protéique) dans le cadre d'une approche moléculaire plus discriminante. La combinaison de ces différentes approches s'avère nécessaire afin de permettre une caractérisation concluante des bactéries notamment des BL en particulier.

4.1. Approche phénotypique

La caractérisation phénotypique allant de la morphologie à la structure cellulaire constitue une étape importante à la description et à l'orientation de l'identification des BL. La morphologie des cellules, à travers l'observation microscopique et la coloration de Gram, est une caractéristique clé à l'identification et à la classification des genres de BL. Elle permet de distinguer notamment les coques des bacilles.

Les caractéristiques physiologiques telles que la croissance à différentes températures et la tolérance au sel ou aux conditions acide et alcaline sont investiguées par des tests simples. Ces derniers sont utiles à la différenciation des genres et des espèces. A titre d'exemple, les entérocoques croissent entre 10°C et 45°C et tolèrent des concentrations élevées en sel. Alors que streptocoques d'une manière générale ne se développent pas à 10°C et certains sont moins tolérants au sel comme c'est le cas pour *S. thermophilus* (Axelsson et Ahrné, 2000 ; König et Fröhlich, 2009).

D'autres caractéristiques biochimiques importantes ont été utilisées pour différencier les espèces de BL en mettant en évidence certaines enzymes ou voies métaboliques. Il s'agit en l'occurrence du mode de fermentation du glucose, de l'hydrolyse des sucres, de l'utilisation de source d'azote, etc. Des marqueurs chimiotaxonomiques relatifs à l'analyse des acides gras membranaires ainsi que des protéines totales de la cellule ont été également introduits dans l'identification des BL (Marconi *et al.*, 2000 ; Khalid, 2011).

Cette approche phénotypique, bien qu'elle soit utile à la description et à la caractérisation des BL, semble insuffisamment discriminante et faiblement reproductible. Effectivement, cette approche

repose sur les caractères exprimés par la bactérie qui peuvent être considérablement influencés par les conditions de culture (Ona-Nguema *et al.*, 2015). L'essor des méthodes moléculaires a ainsi conduit à une meilleure caractérisation bactérienne et a permis de s'affranchir des limites que posait l'identification phénotypique.

4.2. Approche moléculaire

De nombreuses méthodes moléculaires ont été développées pour l'identification et le typage des bactéries d'une manière générale et qui ont été adoptées pour les BL. Ces méthodes, basées essentiellement sur l'analyse des acides nucléiques, constituent un outil essentiel à la caractérisation et à la différenciation des BL, allant du genre jusqu'à l'espèce (Randazzo *et al.*, 2002 ; Ona-Nguema *et al.*, 2015). Les approches moléculaires disposent d'un pouvoir discriminant élevé par rapport aux méthodes phénotypiques. En plus d'être indépendantes des conditions de culture, elles permettent de discriminer des souches ayant des caractéristiques phénotypiques identiques (Mohania *et al.*, 2008). Toutefois, ces méthodes moléculaires sont à considérer avec prudence car elles diffèrent en matière de reproductibilité et de pouvoir discriminant selon la méthode choisie. Parmi les plus courantes d'entre elles, nous pouvons citer l'hybridation ADN-ADN, le séquençage du gène codant l'ARNr 16S, le ribotypage, l'établissement des profils plasmidiques, la technique d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD), l'analyse des fragments de restriction de l'ADN par électrophorèse (PFGE).

Nous développerons, ci-après, quelques exemples d'approches moléculaires habituellement utilisées pour l'identification et la discrimination des BL.

4.2.1. Analyse des séquences du gène codant l'ARNr 16S

Il s'agit d'une méthode génotypique introduite par Fox *et al.* (1980) et Weisburg *et al.* (1991) qui -depuis- est couramment utilisée pour l'identification et la classification bactérienne (Case *et al.*, 2007). Le gène codant l'ARNr 16S est notamment utilisé en raison de son ubiquité et de son universalité (Woese, 1987). En effet, présent chez tous les procaryotes, ce gène est constitué d'une succession de régions conservées, communes à toutes les bactéries, et de régions variables propres à l'espèce (Grimont et Grimont, 1986).

Le principe de la méthode repose sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S sur la base des régions variables. Des amorces universelles complémentaires des extrémités 5' et 3' conservées du gène peuvent être conçues. Elles vont s'hybrider sur l'ADN dans le contexte de réactions de polymérisation en chaîne (PCR). Les données du séquençage sont traitées par comparaison de la

séquence nucléotidique de l'espèce étudiée avec celles disponibles dans les banques de données telles que GenBank/EMBL/DDBJ/ EzBioCloud (Weisburg *et al.*, 1991).

Malgré son efficacité dans l'identification bactérienne, le gène de l'ARNr 16S a montré des limites dans la discrimination de certaines espèces proches en raison de son hétérogénéité puisqu'un seul génome peut en contenir plusieurs copies du gène. C'est ainsi que d'autres gènes ont été proposés au regard de leur universalité et homogénéité (une seule copie dans le génome) tels que le gène codant la sous-unité B de l'ARN polymérase (*rpoB*) ou celui codant la superoxyde dismutase manganèse dépendante *sodA* (Mollet *et al.*, 1997 ; Poyart *et al.*, 1998). Par ailleurs, des régions non codantes, telles que les espaces intergéniques 16S-23S de l'ARNr, ont été orientées pour l'identification bactérienne au niveau de l'espèce et de la souche.

4.2.2- Analyse de l'espace intergénique 16S-23S

Les gènes ribosomiques de l'ARNr 16S et 23S sont séparés l'un de l'autre par une région intergénique appelée ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Cette région est constituée d'une courte séquence nucléotidique hautement variable à la fois en taille et en composition. L'approche basée sur le séquençage de cette région a été proposée par Gürtler et Stanisich (1996) comme marqueur pour l'identification et le typage de groupes taxonomiques proches.

Le principe de la méthode repose sur l'amplification par PCR de cette région au moyen d'amorces synthétisées à partir des extrémités conservées des gènes codant l'ARNr 16S et 23S. Les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose permettant d'apprécier leur taille en comparaison à un marqueur de taille. L'analyse des séquences en comparaison aux bases de données (Genbank) permet d'établir la correspondance entre les séquences (Berthier et Ehrlich, 1998).

4.2.3. Gène *sodA*

Le gène *sodA* code la métallo-enzyme superoxyde dismutase manganèse dépendante (*sodA*). Cette enzyme représente l'un des mécanismes majeurs de lutte contre le stress oxydatif que les bactéries mettent en œuvre. Elle a été identifiée chez les BL, telle que *Lactococcus lactis* et beaucoup d'espèces de streptocoques (Andrus *et al.*, 2003).

Le principe de la méthode est basé sur l'amplification (PCR), au moyen d'amorces dégénératives, d'un fragment interne représentant approximativement 83% du gène *sodA*. Le fragment amplifié est ensuite séquençé, et les séquences ainsi obtenues sont comparées à celles disponibles dans les banques de données (Poyart *et al.*, 1998).

4.2.4. Multi-locus Sequence Typing (MLST)

Il s'agit d'une méthode de typage par séquençage de fragments internes de gènes ou « loci » dits de ménage, indispensables à la vie cellulaire. Le nombre de gènes adoptés dans le premier schéma MLST était de six (Maiden *et al.*, 1998). Toutefois, ce nombre peut augmenter afin d'améliorer le pouvoir discriminant de la technique, il varie entre 6 et 10 en général (Urwin *et al.*, 2003 ; Ménard, 2011).

Pour chaque locus, les séquences nucléotidiques obtenues sont comparées à celles disponibles dans les banques de données (Genbank). Un numéro d'allèle est ensuite attribué à la séquence différente et un profil allélique pour chaque souche (espèce) est établi (Maiden *et al.*, 1998 ; Enright et Spratt, 1999 ; Urwin *et al.*, 2003). Ces profils caractéristiques de chaque souche (espèce) peuvent être déposés dans des banques de données librement accessibles. Le MLST constitue de ce fait la méthode de choix pour les études phylogénétiques. Le typage par MLST est caractérisé par sa reproductibilité élevée permettant le stockage et l'échange des données (Jolley *et al.*, 2004 ; Pavón et Maiden, 2009).

4.2.5. Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD)

L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (*Random Amplified Polymorphic DNA* : RAPD) est une méthode de typage par PCR développée par Williams *et al.* (1990). Elle est basée sur l'emploi d'amorces de petite taille, arbitrairement déterminées, dans des conditions de faible température d'hybridation. Ces amorces vont s'hybrider de façon aléatoire sur le génome inconnu, permettant de générer des fragments de tailles différentes séparés par électrophorèse. Ces fragments, dépendant du nombre de sites d'hybridation et de la distance entre ces sites à séparer par électrophorèse. Ces variations révéleront de ce fait des profils électrophorétiques caractéristiques de l'espèce (voire souche) bactérienne (Williams *et al.*, 1990 ; Vaneechoutte, 1996).

La RAPD présente l'avantage d'être rapide et peu coûteuse. De plus, contrairement aux techniques classiques de PCR, aucune information préalable sur l'organisme étudié n'est exigée. Une détection rapide de la variabilité génétique est ainsi possible avec cette méthode (Cancilla *et al.*, 1992 ; Adesulu-Dahunsi *et al.*, 2017). Cependant, la RAPD est peu reproductible car, même si elle est simple d'utilisation en apparence, elle exige beaucoup de rigueur dans son application. La moindre petite variation d'un paramètre donné peu fortement affecter le résultat final (Coconcelli *et al.*, 1995 ; Van Belkum *et al.*, 1995 ; Yang *et al.*, 2017).

1. Concept de probiotique

L'idée des probiotiques remonte à l'époque où la consommation des produits laitiers fermentés a émergé, auxquels, on reconnaissait des vertus thérapeutiques (voir chapitre I). Plus tard, au début du XX^e siècle, Elie Metchnikoff attribua la longévité des paysans bulgares à la consommation importante de laits fermentés, en particulier aux bactéries lactiques (et plus particulièrement à *Lb. bulgaricus*) contenues dans ces produits. Il supposa alors que l'apport de bactéries bénéfiques pouvait contrecarrer l'effet des bactéries putréfiantes au niveau intestinal, et limiter ainsi les effets du vieillissement. Henri Tissier établit également, dans la même époque, le lien entre un nombre réduit de bifidobactéries dans les selles d'enfants diarrhéiques par rapport aux enfants sains. Il en recommanda l'administration aux enfants malades pour les substituer aux bactéries responsables de diarrhée. Depuis, d'autres scientifiques se sont succédés mettant à jour le même type de relation entre bactéries et effets positifs, différentes souches ont été isolées (Marteau, 2004 ; Faure *et al.*, 2013).

Le terme probiotique a été proposé par Ferdinand Vergin en 1954, repris par Lilly Stillwell en 1965 puis par Parker en 1974. Il trouve son origine du grecque, « pros » et « bios » qui signifie littéralement pour la vie par opposition à antibiotique (contre la vie). Les définitions proposées pour ce terme convergeaient dans le sens de facteurs (issus de microorganismes), organisme ou substance, promoteurs de la croissance d'autres microorganismes, participant à l'homéostasie intestinale. Cependant, l'entité responsable de l'effet positif suggérée par ces définitions était trop large pour Fuller, pouvant inclure partiellement les antibiotiques (pour substance), il proposa en 1991 la définition suivante : « des microorganismes ajoutés à l'alimentation et influençant de manière bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale » (Marteau, 2004 ; Guarner *et al.*, 2005). Au fil des travaux, les définitions ont évolué pour donner lieu à la définition officielle, établie par des experts de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2001 et encore adoptée à ce jour. Ces experts définissent les probiotiques comme « microorganismes vivants qui, lorsque consommés en quantités adéquates, exercent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, au-delà des effets nutritionnels traditionnels ». De cette définition émanent les conditions requises pour un probiotique notamment le bénéfice santé apporté par un microorganisme.

2. Mode d'action et effets bénéfiques des probiotiques

Dès les premières notions de probiotique, le bénéfice santé a toujours été sa caractéristique essentielle, d'ailleurs sans effets positifs prouvés sur la santé, un microorganisme ne peut être

considéré comme un probiotique. Plusieurs de ces effets ont été rapportés dans la littérature pour lesquels les mécanismes d'action ont été démontrés ou supposés. Il est important de rappeler que les effets des probiotiques sont spécifiques à la souche et à cet égard, ils ne peuvent être extrapolés à l'espèce. Les effets positifs des probiotiques découlent de leurs interactions à deux niveaux avec l'environnement de l'hôte. D'abord dans la lumière et sur la paroi intestinale, où ils peuvent agir sur les nutriments et intervenir directement avec les cellules épithéliales. Ensuite, des interactions indirectes sont possibles avec le microbiote intestinal et les pathogènes (Antoine, 2011).

La digestion des nutriments et notamment celle du lactose est l'effet le plus démontré des probiotiques. La lactase des BL du yaourt délivrée dans la lumière intestinale compense le déficit en lactase chez les sujets intolérants au lactose (Pakdaman *et al.*, 2015). Dans le même ordre d'idées, la saccharase de *Saccharomyces cerevisiae* administrée à des enfants déficients en saccharase aide à la digestion du saccharose (Marteau, 2004). D'autre part, certains probiotiques ont la capacité de produire des vitamines et d'améliorer l'absorption des minéraux (Faure *et al.*, 2013). Des effets hypocholestérolémiants ont également été attribués à certaines souches probiotiques de lactobacilles et de bifidobactéries. Le cholestérol serait co-précipité avec les sels biliaires libres issus de la déconjugaison de sels biliaires par ces probiotiques. Ceci est l'une des hypothèses émises pour tenter d'expliquer le mécanisme d'action engagé pour cet effet (Guo et Zhang, 2010).

Au niveau des muqueuses, les probiotiques entrent en interaction directe avec les cellules de l'épithélium intestinal pour stimuler ou moduler le système immunitaire intestinal mais également systémique. Le contact direct des probiotiques avec l'épithélium intestinal peut stimuler la production de cytokines anti-inflammatoires par les cellules épithéliales, d'interleukines par les macrophages et les cellules dendritiques ainsi que la sécrétion d'IgA, dans le cadre d'une immunité innée ou adaptative (Maldonado Galdeano *et al.*, 2015). Ces réponses sont favorisées dans plusieurs pathologies telles que les infections, l'inflammation de l'intestin ou encore les allergies. D'ailleurs, il a été rapporté que l'administration de *Lb. rhamnosus* GG (LGG) à une femme enceinte quatre semaines avant l'accouchement, puis au nouveau-né, avait entraîné la réduction significative de l'apparition de la maladie atopique précoce chez l'enfant. L'une des hypothèses évoquées concernant le mode d'action de ce probiotique est une augmentation de la réponse en IgA et une sécrétion de cytokines qui favorisent la production d'anticorps IgE (Senok *et al.*, 2005).

En compétition sur les nutriments et les sites d'adhésion, les probiotiques renforcent l'effet barrière de l'épithélium intestinal en y adhérant, en serrant les jonctions intercellulaires et en induisant la production de mucus. Ce qui a pour conséquence d'empêcher l'adhésion des pathogènes tel que rotavirus et de diminuer ainsi le risque de diarrhées (Freitas *et al.*, 2003). Il a été démontré que des

souches de *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. reuteri*, *Lb. acidophilus* et *B. longum* contribuaient à la diminution de la sévérité et de la durée des diarrhées à rotavirus chez l'enfant (Senok *et al.*, 2005 ; Park *et al.*, 2017). En outre, plusieurs probiotiques exhibent une activité antimicrobienne propre ou induite contre les pathogènes renforçant ainsi l'effet barrière de l'intestin. Une récente étude a montré l'effet de l'administration des souches de *Lb. casei* et de *Lb. paracasei* à des souris sur l'accroissement de l'activité des cellules de Paneth (cellules immunitaires de l'intestin grêle) dans la sécrétion du peptide antimicrobien dont l'efficacité contre *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium* a été démontrée (Cazorla *et al.*, 2018).

Les interactions directes entre probiotiques et microbiote intestinal ont été soulignées par la capacité de certains probiotiques à stimuler la croissance des membres du microbiote. Ainsi, une souche de *Lb. casei* augmente la concentration fécale des lactobacilles et des bifidobactéries (Spanhaak *et al.*, 1998). Cet effet peut contribuer à l'équilibre du microbiote intestinal après un traitement d'antibiotiques.

3. Principales caractéristiques des probiotiques

3.1. Survie aux conditions du tractus gastro-intestinal : un pré-requis pour être probiotique

Par définition, le probiotique est un microorganisme qui doit conserver sa viabilité, au niveau de l'hôte, pour accéder à son site d'action. Afin de parvenir à cette cible, il est nécessaire que ce microorganisme résiste lors de son passage dans le TGI, à deux stress majeurs. D'abord l'acidité gastrique de l'estomac, qui constitue la première barrière de défense de l'hôte contre les microorganismes ingérés. Cette acidité peut atteindre des valeurs de pH basses notamment lorsque l'estomac est vide, ce qui s'avère bactéricide pour un grand nombre de microorganismes. Passé la barrière de l'estomac, le probiotique se trouve exposé à l'effet détergeant des sels biliaires dont le potentiel antimicrobien est délétère pour beaucoup de microorganismes.

En réalité, les mécanismes sous-jacents aux effets probiotiques sont attribués à l'interaction des probiotiques avec les cellules de l'hôte ou avec d'autres microorganismes (membres du microbiote intestinale ou des agents pathogènes). Cette interaction avec les microorganismes dépend généralement de la viabilité des cellules probiotiques. De surcroît, l'adhésion et la colonisation combien même temporaire de l'hôte requiert des microorganismes vivants capables de s'y multiplier (Taverniti et Guglielmetti, 2011 ; Lahtinen, 2012 ; Monteagudo-Mera *et al.*, 2019).

En effet, la majorité des études cliniques comparant les yaourts avec des cultures vivantes et des yaourts pasteurisés suggèrent que les cellules vivantes sont plus efficaces pour améliorer la digestion du lactose (Lahtinen, 2012). De plus, l'allégation santé liée à la digestion du lactose est

accordée par l'EFSA au yaourt contenant des cultures vivantes de *S. thermophilus* et de *Lb. bulgaricus* (EFSA, 2010). Dans le même contexte, une diminution des symptômes subjectifs d'allergie chez les adultes consommant du yaourt contenant des bactéries vivantes plutôt que mortes a été rapportée dans l'étude de Van de Water *et al.* (1999). Sugahara *et al.* (2017) ont également réalisé une expérience chez des souris pour évaluer les différences entre la forme vivante et morte de la souche *B. breve* M-16V dans la régulation de la fonction immunitaire, du métabolisme intestinal et de l'expression génique intestinale. Les résultats ont montré que les souches vivantes présentaient des effets plus importants dans la régulation du métabolisme intestinal et de l'expression des gènes intestinaux impliqués dans le métabolisme des nutriments. En outre, l'importance de la viabilité des probiotiques dans le traitement des infections à *Helicobacter pylori* a été également soulignée par quelques études (Cats *et al.*, 2003 ; Cruchet *et al.*, 2003). Enfin, Ingrassia *et al.* (2005) insistent aussi sur le caractère « vivant » des probiotiques dotés d'un pouvoir anti-invasif vis-à-vis des pathogènes aux cellules épithéliales.

En revanche, d'autres études ont rapporté des effets positifs liés aux métabolites bioactifs libérés dans l'environnement intestinal par les microorganismes lysés (Taverniti et Guglielmetti, 2011 ; Aiba *et al.*, 2017 ; Tian *et al.*, 2017 ; Plaza-Diaz *et al.*, 2019). Ces auteurs ont souligné que l'interaction directe des probiotiques avec l'hôte peut être réalisée par des cellules bactériennes indépendamment de leur viabilité. En effet, la capacité des cellules humaines à reconnaître des composants ou produits bactériens spécifiques, donnerait lieu à des réponses impliquant généralement le tissu lymphoïde associé aux muqueuses de l'organisme.

Parmi les travaux ayant démontré l'efficacité des microorganismes « probiotiques non-viables », voici quelques exemples rapportés par Adams (2010), Taverniti et Guglielmetti (2011), Lahtinen (2012) et Deshpande *et al.* (2018). Une expérience effectuée *in vitro* sur modèle cellulaire Caco-2 a démontré que les cellules de *Lb rhamnosus*.GG viables et inactivées aux UV exercent les mêmes effets de réduction de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 (Lopez *et al.*, 2008). De même, Laudanno *et al.* (2006) ont traité des Rats Wistar pour une colite expérimentale avec un probiotique breveté administré par voie orale ou sous-cutanée. Un effet anti-inflammatoire et une prévention des lésions gastro-intestinales ont été obtenus avec les cellules probiotiques vivantes et mortes.

D'autre part, si des études ont signalé l'importance des probiotiques vivants dans le traitement des infections à *Helicobacter pylori*, comme cela a été évoqué plus haut, d'autres ont conclu que ce n'était pas une condition. Le traitement de ces infections avec des probiotiques était efficace avec des cellules viables et inactivées (De Vrese et Schrezenmeir, 2002 ; Holz *et al.*, 2015 ; Aiba *et al.*,

2017). De même, dans l'étude menée par Sugahara *et al.* (2017), les formes vivantes et tuées de la souche *B. breve* M-16V ont montré des effets immunomodulants similaires.

Toutefois, la définition officiellement admise des probiotiques insiste sur le caractère vivant des microorganismes qui est considéré comme un critère fonctionnel de sélection de souches probiotiques (FAO/WHO, 2002). Cette définition a été confirmée dans les lignes directrices sur les probiotiques établies par un groupe d'experts en 2013, qui s'est basé sur plusieurs travaux (Hill *et al.*, 2014).

A l'évidence, les effets sur la santé des microorganismes viables ont été explorés beaucoup plus que ceux des microorganismes non-viables (Lahtinen, 2012). Il semblerait alors que les preuves de ces effets (microorganismes non-viables) ne soient pas suffisantes pour actualiser la définition des probiotiques jusque-là admise par la majorité de la communauté scientifique. De plus, même si des effets positifs de microorganismes non-viables sont reconnus, d'autres effets ne sont observés qu'avec des microorganismes vivants.

Il est donc nécessaire, à notre avis, de s'en tenir à cette définition pour les probiotiques tout en marquant la nuance avec les « paraprobiotiques », un terme proposé par Taverniti et Guglielmetti (2011) pour désigner les effets positifs apportés par des cellules non-viables.

3.1.1. Présentation du tractus gastro-intestinal

Le tractus gastro-intestinal (TGI) est composé de la cavité buccale, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et le gros intestin (cæcum, appendice, colon ascendant et descendant, rectum et anus) (figure 04). De l'œsophage au canal anal, le TGI est organisé, en allant vers la lumière digestive, en quatre tuniques successives de tissus : la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse.

Le rôle du système digestif est la transformation de la nourriture en nutriments qui seront absorbés le long des muqueuses de l'intestin. En effet, les aliments ingérés sont prédigérés par la mastication et les enzymes de la salive au niveau de la bouche. Arrivé à l'estomac à travers l'œsophage par péristaltisme, le bol alimentaire est imprégné de sucs gastriques, puis il passe à l'intestin grêle. A ce niveau, les sels biliaires, le suc pancréatique et les enzymes, tamponnent l'acidité provenant de l'estomac, dégradent les particules alimentaires du chyme (liquide résultant de la digestion au niveau de l'estomac) en nutriments qui seront quasi absorbés tandis que les particules non digérées passent au côlon pour y être stockées avant excréation (Mackie et Rigby, 2015).

Malgré les conditions hostiles de cet environnement, des microorganismes arrivent à s'y adapter et s'y développer constituant le microbiote du TGI qui compte environ 400 à 1000 espèces autochtones et allochtones diversifiées. Au niveau de l'estomac, nous retrouvons des espèces acidotolérantes ($<10^3$ UFC/g) telle que *Helicobacter pylori* ou des espèces de lactobacilles comme *Lb. fermentum*. Dans l'intestin, les *Firmicutes* (lactobacilles, streptocoques, bifidobactéries, etc.), les bactéroïdes et les actinobactéries s'installent de plus en plus (10^3 - 10^4 UFC/g dans l'intestin grêle et 10^{11} - 10^{12} UFC/g dans le côlon) se nourrissant des métabolites des cellules humaines (Coudeyras et Forestier, 2010 ; Walter et Lay, 2011 ; Quinto *et al.*, 2014). Ce microbiote ainsi que l'épithélium tapissant les muqueuses du TGI forment une barrière physique et chimique contre les microorganismes pathogènes, lui conférant par conséquent un rôle de protection (Chaffanel, 2016).

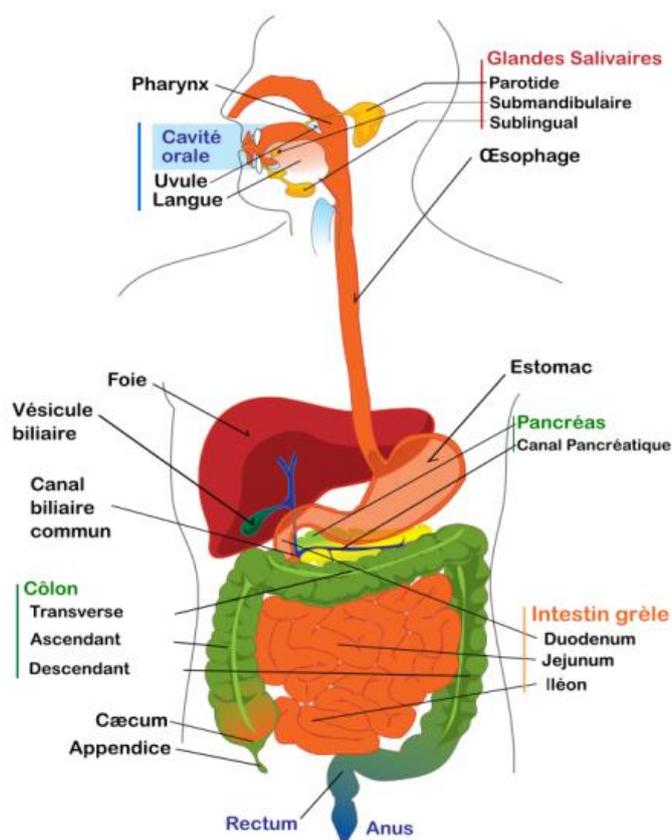


Figure 04. Anatomie du tractus gastro-intestinal

(http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/module_Physiologie_58.html. Consulté le 20.03.2020)

3.1.2. Résistance des bactéries aux stress du tractus gastro-intestinal

Le stress peut être défini, à l'échelle bactérienne, comme étant l'état physiologique induit par un ensemble de facteurs environnementaux, de nature physique, chimique ou biologique, provoquant

des altérations du métabolisme bactérien, lesquelles sont préjudiciables à la croissance bactérienne pouvant conduire à son inhibition. Cet état de stress impose aux bactéries de mettre en œuvre des mécanismes leur permettant de survivre aux environnements hostiles (Carlier, 1997 ; Booth, 2002).

Dans le TGI, les bactéries ingérées sont exposées à plusieurs stress dont les plus importants sont les stress acide et biliaire. La capacité de survie à ces conditions dépend essentiellement de la résistance intrinsèque de la bactérie (Drouault et Corthier, 2001 ; Marteau et Shanahan, 2003) et varie considérablement selon le genre, l'espèce, voire même la souche. Il est connu que les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes au stress biliaire que celles à Gram positif (Begley *et al.*, 2005).

3.1.2.1. Survie au stress acide

Le pH acide est un facteur environnemental pouvant affecter la croissance bactérienne, voire l'inhiber.

Dans leur environnement naturel, les BL sont soumises à un stress acide dû à leur propre production d'acide lactique lors du processus de fermentation. L'accumulation de ce dernier dans le milieu, par exemple durant l'étape de stockage de produits fermentés, peut marquer l'arrêt de la croissance bactérienne. En effet, à faible pH, l'acide lactique représenté par sa forme non dissociée ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) traverse la membrane plasmique par diffusion passive. Dans le cytoplasme, l'acide lactique se dissocie en lactate ($\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$) et libère un proton (H^+) dont l'accumulation excessive provoque l'acidification du cytoplasme (Cotter et Hill, 2003 ; Serrazanetti *et al.*, 2009).

D'autre part, une fois ingérées, les BL se trouvent confrontées à l'acidité de l'estomac lors du passage dans le TGI de leur hôte, où le pH varie approximativement de 1 à 5 selon que l'estomac est vide ou rempli (Chen *et al.*, 2009). Les acides forts qui constituent l'environnement gastrique ne peuvent traverser la membrane plasmique des bactéries par simple diffusion. Toutefois, ils diminuent fortement le pH externe provoquant une variation importante de celui-ci, de part et d'autre de la membrane plasmique. En conséquence, l'afflux de protons vers le cytoplasme conduit à son acidification (Beales *et al.*, 2004) qui peut s'avérer délétère pour les bactéries impactant ainsi l'intégrité membranaire et les fonctions cellulaires. Face à ce stress acide, les bactéries mettent en œuvre des mécanismes au niveau membranaire et cytoplasmique.

Au niveau du cytoplasme, ces mécanismes visent d'une part, à contrôler le pH intracellulaire principalement par l'alcalinisation du cytoplasme à travers des systèmes enzymatiques consommant des protons ou produisant de l'ammonium. D'autre part, ces mécanismes sont impliqués dans la

protection et la réparation des constituants de la cellule à savoir l'ADN et les protéines par l'activation d'un certain nombre de gènes dits de stress. Le résultat de cette stratégie est, soit l'adaptation des bactéries à ces nouvelles conditions ou la mort (Van De Guchte, *et al.*, 2002 ; Koponen *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2014b).

a. Préservation de l'intégrité membranaire

La membrane cellulaire est une structure essentielle de la cellule qui protège ses constituants et assure des fonctions physiologiques. Elle dispose d'une perméabilité sélective et d'une fluidité optimale (pour la fonction des protéines membranaires H⁺ ATPases) qu'elle doit à sa constitution riche en lipides (Zhang et Rock *et al.*, 2008 ; To *et al.*, 2011).

De par son rôle important, la membrane cellulaire doit maintenir son intégrité face aux agressions environnementales. En réponse au stress acide, les bactéries procèdent essentiellement à la modification de la composition d'acides gras membranaires (Zhang et Rock *et al.*, 2008 ; Kajfasz Quivey, 2011). Dans des conditions de faible pH, la proportion d'acides gras membranaires mono-insaturés notamment à longue chaîne augmente chez *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. salivarius*, *S. macedonicus* et *Lb. casei* réduisant la perméabilité de la membrane aux protons (Fozo et Quivey, 2004a ; Wu *et al.*, 2012b). Aussi, une faible activité de l'enzyme FabM liée à la mutation du gène *fabM* rend *S. mutans* plus sensible à l'acidité. Le FabM (*fabM* faisant partie de l'opéron *fab*) étant le seul mécanisme par lequel les acides gras mono-insaturés sont formés chez les streptocoques (Fozo *et al.*, 2004 ; Kajfasz Quivey, 2011). De la même manière que *S. mutans*, la sensibilité à l'acidité augmente chez *S. macedonicus*, en conditions de bas pH, suite à l'inhibition de la biosynthèse d'acides gras par la céruléine. Celle-ci inhibe spécifiquement l'activité de la FabF codée par le gène *fabF* de l'opéron *fab* (Fozo et Quivey, 2004b ; Papadimitriou *et al.*, 2007 ; 2008).

En outre, un accroissement d'acide gras cyclopropane (CFA) dans la membrane a été observé pour *Lb. casei*, *Lb. helveticus* et *Lb. sanfranciscensis* en conditions acides (Broadbent *et al.*, 2010 ; Montanari *et al.*, 2010). L'inactivation du gène codant l'enzyme de la synthèse de la cyclopropane (cyclopropan FA synthase) entraîne l'accroissement de la sensibilité de *Lb. acidophilus* à l'acidité (Klaenhammer *et al.*, 2005). En revanche, ce gène ne semble pas être impliqué dans la survie à l'acidité chez *L. lactis* subsp. *cremoris* (To *et al.*, 2011).

Par ailleurs, les acides lipotéichoïques (LTA), qui traversent le peptidoglycane semblent également être impliqués dans la résistance à l'acidité. Pour rappel, les sous-unités de glycérolphosphate du LTA peuvent être remplacées par des résidus glycosyl et/ou des esters de D-alanyl, codés par l'opéron *dlt* (*dltA*, *dltB*, *dltC*, *dltD*) pendant la maturation de la paroi. Il a été rapporté que la

mutation des gènes *dltC* et *dltD* conduit à l'accroissement de la sensibilité à l'acidité chez *S. mutans* et *Lb. rhamnosus* GG par la baisse de la perméabilité membranaire (Boyd *et al.*, 2000 ; Velez *et al.*, 2007b). De surcroît, Papadimitriou *et al.* (2008) ont observé une expression du gène codant l'enzyme 1,2-diacylglycérol 3-glucosyltransférase chez *S. macedonicus* en conditions de faible pH. Cette enzyme étant impliquée dans la biosynthèse de la fraction glycolipidique d'ancrage du LTA à la paroi.

b. Maintien de l'homéostasie du pH intracellulaire

b.1- H⁺-ATPase

Les protéines membranaires F₀F₁-ATPase (H⁺-ATPase) ont un rôle direct dans le maintien de l'homéostasie du cytoplasme bactérien. Ces protéines assurent la synthèse d'ATP à partir de la phosphorylation d'ADP en utilisant des protons ou inversement l'expulsion des protons de la cellule avec l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Cette élimination de protons du cytoplasme contribue ainsi à son alcalinisation (Van De Guchte, *et al.*, 2002 ; Kajfasz Quivey, 2011).

L'activité et le niveau d'expression du complexe protéique F₀F₁-ATPase semble être élevés en conditions de bas pH chez les BL telles que *L. lactis* (Sanders *et al.*, 1999), *S. macedonicus* (Papadimitriou *et al.*, 2007), *S. thermophilus* (Arena *et al.*, 2006), *Lb. rhamnosus* GG (Koponen *et al.*, 2012) ou encore *Bifidobacterium* (Ebel, 2012). D'ailleurs, l'inactivation de ce complexe s'accompagne d'une baisse de résistance à l'environnement acide chez *Lb. helveticus* (Yamamoto *et al.*, 1996).

D'autres types d'ATPases peuvent également intervenir. Pour exemple, une forte activité des ATPases membranaires a été observée chez *B. animalis* alors qu'elle n'a pas été induite chez les souches moins résistantes à l'environnement acide (Ebel, 2012).

b.2. Décarboxylation des acides aminés

Les décarboxylases d'acides aminés participent au maintien de l'homéostasie du pH interne des bactéries par consommation de protons intracellulaires (Higuchi *et al.*, 1997). Au cours des réactions de décarboxylation, l'acide aminé internalisé dans la cellule bactérienne est associé à un proton pour produire du CO₂ et l'amine correspondante. Laquelle est transférée vers le milieu extracellulaire et échangée contre une nouvelle molécule d'acide aminé. Il en résulte la création d'un gradient de protons et donc d'une force proton-motrice génératrice d'énergie (Cotter et Hill, 2003 ; Papadimitriou *et al.*, 2016).

Parmi les réactions de décarboxylation les plus fréquemment rencontrées chez les BL, citons le système glutamate décarboxylase et l'histidine décarboxylase. Le premier mène à la transformation

du glutamate en acide γ -aminobutyrique (GABA). Cette voie est induite lors d'un stress acide chez de nombreuses espèces bactériennes (Feehily et Karatzas, 2013) dont *L. lactis*, *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. brevis*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* (Papadimitriou *et al.*, 2016) et *Lb. reueti* (Su *et al.*, 2011). Son inactivation accroît la sensibilité de *L. lactis* à l'acidité (Sanders *et al.*, 1998). Le second est une histidine décarboxylase. La survie de *L. lactis* et de *S. thermophilus* dans des conditions de stress acide est améliorée par l'activité histidine décarboxylase en synergie avec la voie de la glycolyse (Trip *et al.*, 2012).

b.3. Voie de l'arginine déiminase

La voie de l'arginine déiminase (ADI), également désignée système de l'arginine dihydrolase (ADS), neutralise le cytoplasme par la production d'ammonium et d'ATP. L'ADI est composée de trois enzymes : arginine déiminase (arginine dihydrolase), ornithine transcarbamylase et carbamate kinase (Sanders *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 2018). Ces enzymes catalysent la conversion de l'arginine en citruline qui est ensuite dégradée en ornithine. Cette dernière est échangée dans le milieu extracellulaire contre une nouvelle molécule d'arginine. Le bilan de ces réactions est une production concomitante d'ammoniaque (NH_3), de CO_2 et d'ATP. L'alcalinisation du cytoplasme est dès lors atteinte par la présence d'ammoniaque, la consommation de protons par le NH_3 pour former les ions d'ammonium (NH_4^+), et la production d'ATP utilisée pour l'expulsion de protons par la F_0F_1 -ATPase (Van De Guchte *et al.*, 2002 ; Kajfasz Quivey, 2011 ; Le Lay, 2014).

L'implication possible de la voie ADI en cas de stress acide chez les BL a été rapportée pour *E. faecium*, qui semble dégrader l'arginine dans des conditions extrêmement acides et fait remonter le pH avec accumulation de NH_3 (Wu *et al.*, 2014b). Chez *Lb. casei*, une accumulation intracellulaire d'arginine induite par des conditions de bas pH a été démontrée. Cette espèce semble orienter son métabolisme vers la biosynthèse d'arginine nécessaire au système ADI, surtout que sa résistance à l'acidité est améliorée par l'addition d'arginine dans le milieu (Wu *et al.*, 2012a).

Il existe une autre voie analogue à l'ADI qui est la voie agmatine déiminase (AgDI). Elle comporte également trois enzymes et fonctionne avec le même principe que l'ADI en convertissant l'agmatine (issue de la décarboxylation de l'arginine) en putrescine (Lucas *et al.*, 2007 ; Del Rio *et al.*, 2015). Cette voie a été détectée chez certaines BL, telles que *S. mtans*, *Lb. brevis*, *E. faecalis* et *L. lactis*, et pourrait présenter un moyen de lutte contre le stress acide en produisant du NH_3 et de l'ATP (Kajfasz Quivey, 2011 ; Del Rio *et al.*, 2015 ; Papadimitriou *et al.*, 2016). En revanche, AgDI présente un risque pour la santé humaine de par sa production d'amine biogène : la putrescine (Papadimitriou *et al.*, 2016).

b.4. Voie uréase

L'uréase et l'ADI constituent les principales voies de production de composés alcalins chez les BL en vue de préserver l'homéostasie du pH interne. L'uréase est une nickel- métal-enzyme qui hydrolyse l'urée en CO₂ et en ammoniacque (deux molécules d'ammoniacque par molécule d'urée). L'alcalinisation du pH interne est le résultat non seulement de l'ammoniacque produit mais aussi de la consommation de protons lors de la formation d'ions NH₄⁺ via le NH₃ (Van De Guchte *et al.*, 2002 ; Le Lay, 2014).

L'activité uréasique a été détectée surtout chez *S. salivarius* et constitue une importante stratégie d'alcalinisation et de maintien de l'homéostasie du pH dans l'environnement acide de la cavité buccale (Papadimitriou *et al.*, 2016). Cette activité a également été identifiée chez *S. thermophilus* (Mora *et al.*, 2005). La quasi-totalité des souches de cette espèce testées par Junjua *et al.* (2016) disposent de cette activité qui s'exprime dans des environnements acides. Uriot *et al.* (2016) ont constaté qu'une souche *S. thermophilus* dépourvue de cette activité était plus sensible à l'acidité gastrique *in vitro* que les souches qui l'exprimaient.

c. Protection et réparation des macromolécules

La conséquence majeure de l'acidification du cytoplasme est la dénaturation de l'ADN et des protéines qui se répercute sur leurs fonctions physiologiques indispensables à la vie de la cellule. Les mécanismes développés dès lors, par les bactéries visent principalement à prendre en charge les molécules d'ADN et de protéines dénaturées via des systèmes de réparation ou d'évacuation des molécules irréparables.

La perte des bases puriques et pyrimidiques endommageant l'ADN par l'effet du stress acide sont palliées par l'action du complexe UvrA-UvrB (système de réparation-excision). En effet, ce dernier agit sur l'ADN endommagé ou mal conformé en s'y fixant. UvrA est remplacé ensuite par UvrC qui supprime les sections de l'ADN endommagées et les re-synthétisent par le biais d'une ADN polymérase, puis les régions supprimées sont évacuées par l'UvrD (Hanna *et al.*, 2001).

L'expression du gène *uvrA* en stress acide a été observée chez *Lb. helveticus* (Cappa *et al.*, 2005). La mutation de ce gène chez *S. mutans* a augmenté sa sensibilité à l'acidité (Hanna *et al.*, 2001). Ceci suggère l'implication du système UvrA dans le stress acide en réparant probablement la molécule d'ADN endommagé par ce stress. En outre, il a été rapporté, l'induction de carbamoylphosphate synthase (CarB) chez *S. macedonicus* en conditions acides. Le carbamoylphosphate étant un intermédiaire dans la biosynthèse des bases pyrimidiques et

d'arginine permettant ainsi de contrer les pertes en pyrimidines dues au stress acide (Papdimitriou *et al.*, 2008).

Par ailleurs, la stratégie développée par les bactéries vis-à-vis des protéines dénaturées suite à l'acidification du cytoplasme consiste en un système de protéines chaperonnes pour assister au repliement correct des protéines mal repliées, et un système de protéolyse pour détruire et éviter l'accumulation des protéines complètement endommagées. Parmi les chaperonnes (dites de stress thermique *Heat shock proteins* : Hsp) et les protéases les plus mobilisées en conditions de stress acide chez les BL, figurent les DnaK (Hsp70), GrpE, GroEL, GroES, Small Hsp (sHsp) et les protéases ATP-dépendantes de la famille Clp. Leur implication dans la réponse au stress acide a été démontrée (Wang *et al.*, 2018). Pour exemples, chez une souche de *L. lactis*, l'expression du gène *dnaK*, issu d'*E. coli*, lui confère une meilleure survie en milieu acide (Sugimoto *et al.*, 2010). De la même manière, la production de la petite protéine de stress (sHsp) Lo18 d'*Oenococcus oeni* chez une souche de *L. lactis*, a amélioré la résistance de cette dernière à l'acidité (Weidmann *et al.*, 2017). La sHsp issue de *S. thermophilus* a également augmenté la résistance aux stress acide, biliaire, oxydant et thermique chez *L. lactis* (Tian *et al.*, 2012). D'ailleurs les souches les plus résistantes de *S. thermophilus* à l'acidité dans les travaux de Junjua *et al.* (2016) et Uriot *et al.* (2016) possèdent les protéines Hsp. En outre, Guillouard *et al.* (2004), Arena *et al.* (2006) et Zotta *et al.* (2008) ont démontré l'expression des gènes *GroEL* et *GroES* chez *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus* en conditions de faible pH.

Des travaux ont également montré que les protéases ClpC et ClpP peuvent être induites en milieu acide chez *S. mutans*, *E. faecalis*, *Lb. bulgaricus* et *Lb. johnsonii*, indiquant la nécessité d'éliminer les protéines altérées ou d'agir en tant que chaperonnes pour stabiliser leur bon pliage (Kajfasz Quivey, 2011). En plus du système Clp, d'autres protéases extracellulaires, telle que HtrA, sont incriminées dans la réponse au stress acide et semblent être induites chez *S. mutans* (Kang *et al.*, 2010).

3.1.2.2. Survie au stress biliaire

Au cours de leur transit dans le TGI, les bactéries ayant franchi la barrière acide de l'estomac, subissent un stress majeur dans l'intestin à savoir l'action détergente des sels biliaires (SB), principaux constituants de la bile. Ce stress conditionne fortement la survie des bactéries notamment des probiotiques (Sánchez, 2018).

Il est à rappeler que la bile est une sécrétion digestive synthétisée par le système hépatique et stockée dans la vésicule biliaire. Elle est excrétée dans l'intestin grêle (le duodénum) lors de la

digestion où elle assure, à travers les SB, l'émulsion et la solubilisation des graisses provenant de l'alimentation. Ainsi la nature du repas (riche ou pauvre en graisses) par exemple peut influencer la concentration en SB. En effet, celle-ci n'est pas constante et peut varier dans des conditions physiologiques normales, de moins de 1 mM à plus de 40 mM (tableau 03) avec une concentration maximale de 10 mM au niveau de l'intestin grêle (Begley, *et al.*, 2005 ; Bajor *et al.*, 2010 ; Ruiz *et al.*, 2013).

Les SB sont produits dans le foie à partir du cholestérol. Dix-sept enzymes convertissent le cholestérol en acides biliaires primaires : cholate et chénodésoxycholate, qui sont transformés en sels biliaires par l'association d'ions Na⁺ ou K⁺. Ces SB primaires subissent une conjugaison, avant leur sécrétion, impliquant la formation d'une liaison amide avec la taurine ou la glycine. Cette conjugaison ainsi que la présence des groupements hydroxyle augmentent la solubilité des SB au pH physiologique et par conséquent leur action détergente (Begley *et al.*, 2005 ; Philipp, 2011).

D'autre part, une partie des SB primaires est convertie via le microbiote intestinal en SB secondaires par hydrolyse de la liaison amide sous l'action des enzymes BSH (*Bile Salt Hydrolase*) et élimination du groupe hydroxyle en C7. Cette transformation aboutit aux SB déconjugés secondaires désoxycholate et lithocholate issus respectivement, du cholate et du chénodésoxycholate (Begley *et al.*, 2005 ; Moghimipour *et al.*, 2015).

Tableau 03. Concentration des sels biliaires dans différents tissus de l'organisme humain (Bajor *et al.*, 2010)

Tissus de l'organisme	Concentration en SB
Plasma à jeun	20-50 µmol/L
Plasma post prandial	Concentration croissante
Canaux biliaires	20-50 mmol/L
Vésicule biliaire	300 mmol/L
Petit intestin	10 mmol/L
Cæcum	1 mmol/L

Les SB sont réabsorbés le long de l'intestin grêle, atteignent la circulation sanguine et rejoignent le foie par la veine porte où ils seront re-synthétisés, conjugués puis excrétés de nouveau dans la bile. Le pool de SB étant composé de 50% de cholate, 30% de chénodésoxycholate, 20% de désoxycholate et des traces d'autres SB (Bajor *et al.*, 2010).

Outre leur important rôle dans la digestion des lipides alimentaires, les SB exhibent une forte action antimicrobienne vis-à-vis des bactéries transitant par le TGI. La nature lipophile du noyau stéroïdien fait de la membrane bactérienne la première cible d'attaque des SB dont la toxicité semble être liée à leurs type et nature physico-chimique. Effectivement, les SB conjugués se comportent comme des acides forts ne pouvant pas traverser la membrane par simple diffusion. Ils persistent alors au niveau des couches lipidiques membranaires où ils exercent leur pouvoir détergent tandis que les SB non conjugués agissent comme des acides faibles qui pénètrent à travers la membrane pour se retrouver dans la cellule et y dénaturer les constituants. De surcroît, la nature hydrophobe des SB déconjugués ou libres les rend plus toxiques pour la cellule bactérienne que les SB conjugués (Begley *et al.*, 2006 ; Bustos *et al.*, 2018).

A l'instar du stress acide, le stress biliaire provoque le déclenchement des mécanismes de lutte chez les bactéries qui le subissent afin de contrecarrer les effets toxiques des SB et de s'y adapter (figure 05). C'est le cas des bactéries entériques par exemple qui ont développé des mécanismes de résistance au stress biliaire leur permettant de s'adapter et de s'implanter dans l'environnement intestinal (Trastoy *et al.*, 2018).

a. Action détergente des sels biliaires sur les membranes et mécanismes de lutte

De par les études génomiques et protéomiques chez différentes espèces, il est admis que les SB sont des molécules amphipatiques tensioactives ayant une activité antimicrobienne puissante. En effet, les perturbations structurales de l'enveloppe cellulaire induites par l'action des SB affectent la morphologie des cellules et des colonies. Cet effet a été utilisé comme marqueur de résistance aux SB chez des souches de *Lactobacillus* où les colonies rugueuses sont plus sensibles que les lisses en raison de modifications de l'architecture de l'enveloppe cellulaire (Šušćković *et al.*, 2000 ; Ruiz *et al.*, 2013). Ces désorganisations structurales de la membrane cellulaire se répercutent sur la structure et la fonction des protéines membranaires, la composition lipidique et la perméabilité de la membrane. Afin de contrecarrer ces effets, les bactéries mettent en place des mécanismes visant à maintenir l'intégrité membranaire (Begley *et al.*, 2005 ; Ruiz *et al.*, 2007).

Selon Taranto *et al.* (2006), la réponse physiologique à une exposition de *Lb. reuteri* aux SB serait un enrichissement de la membrane en acides gras insaturés et en glycolipides dans le but de renforcer sa stabilité. D'ailleurs, un accroissement d'acides gras insaturés a été observé en présence de bile chez les souches de *Lb. brevis* les plus tolérantes à la bile (Suzuki *et al.*, 2014). Chez *Lb. casei* Zhang, une forte induction des protéines GalU (UDP-glucose pyrophosphorylase) et NagA (N-Acetylglucosamine-6-phosphate déacétylase) a été observée après une exposition à la bile. Il s'agit d'enzymes impliqués dans les voies de synthèse de glycolipides et de l'acide téchoïque de la

membrane cellulaire (Wu *et al.*, 2010). Pour les bifidobactéries, le changement de la composition des lipides membranaires est considéré comme une réponse adaptative au stress biliaire réduisant la diffusion des SB dans le cytoplasme (Ruiz *et al.*, 2007 ; Ruiz *et al.*, 2013).

Une autre réponse, au niveau membranaire, des bactéries au stress biliaire consiste en la modulation de l'expression des gènes codant les protéines de surface. Ainsi, chez *Lb. plantarum*, les gènes *mub* et *map* codant la protéine de liaison au mucus sont surexprimés après l'exposition aux SB (Duany *et al.*, 2012). De même, l'inactivation des gènes codant les protéines de surface PrtS et MucBP a affecté la survie de *S. thermophilus* LMD-9 aux SB (Kebouchi *et al.*, 2016).

En outre, les protéines membranaires, telles que les pompes à efflux MDR (*multidrug resistance*), contribuent à la détoxification des cellules exposées aux SB. Leur rôle consiste à expulser du cytoplasme les produits toxiques pour la cellule en l'occurrence les SB. Elles ont été détectées chez plusieurs bactéries entériques et pathogènes ainsi que chez certaines BL. Ainsi, l'expression de deux gènes *BL0920* et *Bbr0838* codant des transporteurs MDR a été observée, respectivement chez *B. longum* et *B. breve* exposés à la bile. Il est à noter que l'expression de *BL0920* conférait à *Echerichia coli* une résistance au stress biliaire (Gueimonde *et al.*, 2009). Chez *Lb. acidophilus*, la délétion des gènes codant des transporteurs appartenant à la famille des transporteurs MDR a engendré une sensibilité accrue à la bile (Pfeiler et Klaenhamme, 2009). Également, la régulation positive des gènes codant des transporteurs secondaires MDR a potentiellement contribué à l'expulsion des SB de la cellule de *Lb. salivarius* (Lv *et al.*, 2017).

Il a été signalé que d'autres protéines membranaires étaient surproduites en conditions de stress biliaire. Il s'agit notamment de la F₀F₁-ATPase qui tend à préserver l'homéostasie du pH intracellulaire. Celle-ci est déséquilibrée par l'accumulation intracellulaire des protons issus de la dissociation des SB non conjugués. Ce mécanisme de réponse au stress biliaire a été identifié chez *B. animalis* subsp. *lactis* (Sánchez *et al.*, 2006).

Par ailleurs, il a été démontré que les bactéries exposées au stress biliaire peuvent produire des EPS qui agiraient comme une couche protectrice. La relation entre les EPS et la tolérance au stress biliaire a été mise en évidence pour *Bifidobacterium* (Ruas-Madiedo *et al.*, 2009 ; Alp et Aslim, 2010 ; Leivers *et al.*, 2011), *S. thermophilus*, *Lb. Bulgaricus* (Boke *et al.*, 2010), *Lb. brevis* (Suzuki *et al.*, 2014) et *Lb. reuteri* (Fedorová *et al.*, 2018).

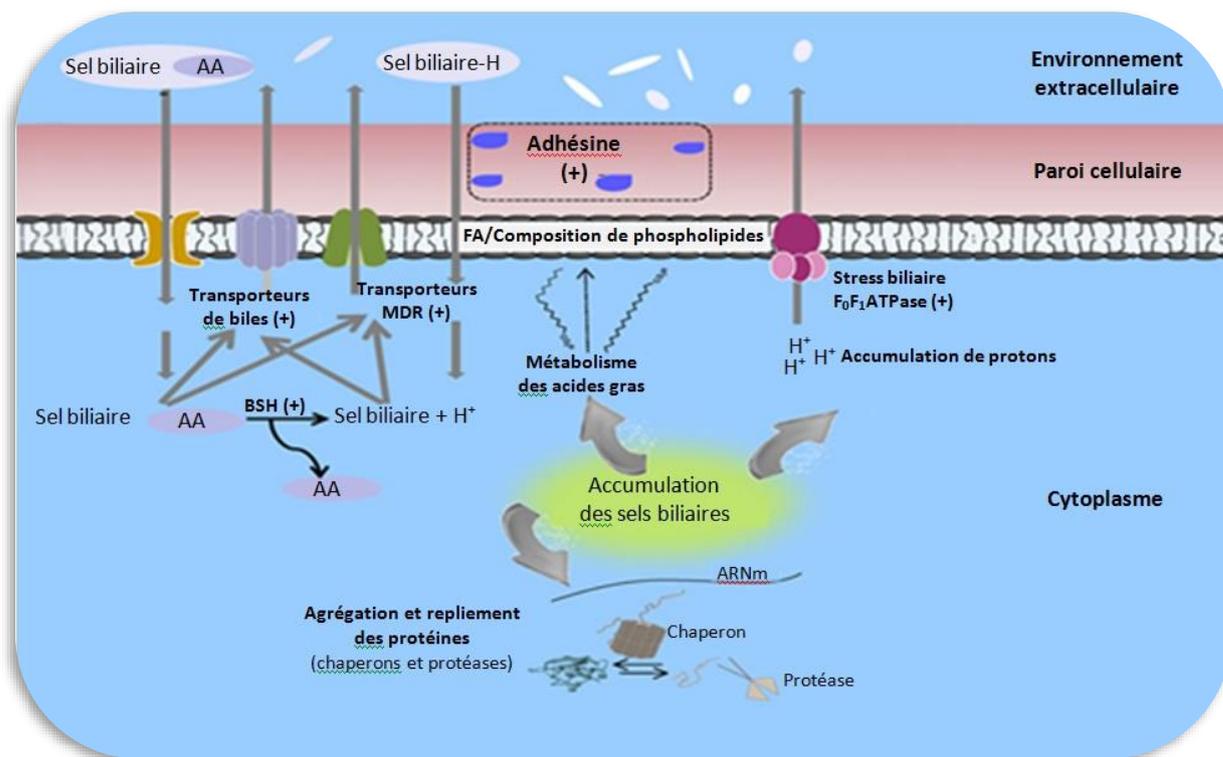


Figure 05. Mécanismes de réponse des bifidobactéries au stress biliaire
(adapté de Sánchez *et al.*, 2013)

L'augmentation de l'expression des gènes ou de la concentration en protéines est représentée par un signe positif. AA : glycine ou taurine ; FA: acide gras ; BSH : *Bile Salt Hydrolase* (hydrolase de sels biliaires); MDR : *Multi Drug Resistance* (multi-résistance aux médicaments); bile salt-AA : sel biliaire conjugué ; bile salt-H : sel biliaire libre.

b. Effets toxiques des SB dans la cellule et mécanismes de réponses

b.1. Réparation et protection des constituants cellulaires

Les membranes bactériennes étant compromises par l'action des SB, les effets toxiques de ces derniers sont transmis aux constituants cellulaires (Merritt et Donaldson, 2009). La dénaturation des molécules d'ADN par les SB déclenche des mécanismes visant leur réparation (Begley *et al.*, 2005). A titre d'exemple, les gènes *uvrA* imputés aux systèmes de réparation (excision-réparation) de l'ADN ainsi que *recA* sont induits lors de l'exposition de *Listeria monocytogenes* à la bile qui lui confèrent sa résistance à celle-ci (Van der Veen et Abee, 2011). De même, les études protéomiques ont confirmé la régulation positive de RecA et UspA sous stress biliaire chez *Lb. fermentum* (Kaur *et al.*, 2017).

Outre l'ADN, les protéines sont également affectées par les SB qui peuvent modifier leur conformation et les dénaturer. Des protéines chaperonnes sont alors induites pour pallier les

dommages occasionnés (Begley *et al.*, 2005). Effectivement la surexpression des gènes codant les protéines de stress DnaK, GroESL, ClpC et FtsH chez les BL suite à l'exposition aux SB a été démontré par plusieurs études (Corcoran *et al.*, 2008). L'expression des gènes codant les protéines DnaK et GroEL a été détectée chez *Lb. casei* Zhang après exposition aux SB (Wu *et al.*, 2010), ainsi que pour FtsH chez *Lb. plantarum* (Bron *et al.*, 2006).

Par ailleurs, d'autres protéines sont synthétisées pour protéger les cellules contre le stress oxydant induit par les SB à travers la génération de radicaux libres (Begley *et al.*, 2005). Ainsi l'accroissement de l'expression du gène codant la glutathion réductase et de l'opéron *metC-cysK* lors de l'exposition de *Lb. plantarum* à la bile semble être impliqué dans sa protection contre le stress oxydant (Bron *et al.*, 2006).

b.2. Action des hydrolases de sels biliaires (BSH)

Les enzymes d'hydrolyse des SB (BSH) appartiennent à la famille choloylglycine hydrolase. Elles catalysent l'hydrolyse de la liaison amide dans les SB conjugués à la glycine ou à la taurine libérant des acides aminés et des SB. Cette réaction ouvre des voies plus larges aux modifications des SB par les bactéries du microbiote intestinal. A travers la déshydroxylation principalement et la déshydrogénation, elles génèrent des SB secondaires et tertiaires (Patel *et al.*, 2010 ; Ru *et al.*, 2019).

L'implication de l'activité BSH dans la résistance des bactéries aux SB a été rapportée par plusieurs études malgré le fait que son absence chez certaines espèces ou souches n'a pas obligatoirement d'incidence sur leur survie au stress biliaire. Chez des espèces de lactobacilles, le lien entre l'activité BSH et la résistance à la bile a été indiqué (Begley *et al.*, 2006) alors que pour *Lb. salivarius*, ce lien n'est pas toujours évident (Fang *et al.*, 2009). Pour *B. animalis*, l'induction positive de BSH a été observée chez des souches adaptées à la bile par rapport aux isolats sauvages (Sánchez *et al.*, 2007). De même l'expression de l'activité BSH chez *L. lactis* a amélioré, *in vitro*, sa résistance à la bile par rapport à la souche sauvage (Bi *et al.*, 2016).

A l'évidence, le mécanisme par lequel l'activité BSH peut conférer une protection contre les SB n'est pas complètement élucidé (Bustos *et al.*, 2018). Les formes non conjuguées, générées par les réactions à BSH, sont plus hydrophobes et toxiques car elles peuvent pénétrer librement dans les cellules. Une des hypothèses de l'action détoxifiante de la BSH est que les bactéries ayant une activité BSH pourraient engendrer la précipitation de ces SB déconjugués au niveau de l'intestin sous conditions de faible pH provoqué par la fermentation des BL. Une autre hypothèse stipule que les SB déconjugués à l'intérieure de la cellule par l'action de la BSH se comportent comme des acides plus faibles que leurs homologues conjugués pouvant capturer des protons et compenser de

ce fait la chute du pH intracellulaire dû à l'accumulation des acides biliaires (Begley *et al.*, 2005 ; Ridlon *et al.*, 2016 ; Bustos *et al.*, 2018). D'autre part, Dussurget *et al.* (2002) ont indiqué que *Listeria monocytogenes* était plus sensible aux SB conjugués qui affichaient une toxicité plus élevée vis-à-vis de cette espèce que leurs homologues déconjugués. Ce constat conforte l'hypothèse de l'action détoxifiante des enzymes BSH par déconjugaison.

Par ailleurs, la distribution de l'activité BSH est variable chez les espèces bactériennes. Sa présence pourrait être liée à l'environnement dans lequel ces espèces évoluent. Il a été rapporté que les bactéries d'origine intestinale, habitant un environnement riche en SB, possèdent une activité BSH, ce qui n'est pas le cas pour celles isolées des végétaux ou des produits laitiers. Sur 300 souches lactiques de différents genres étudiées par Tanaka *et al.* (1999), toutes les bifidobactéries présentent une activité BSH, seulement quelques espèces de lactobacilles et quelques souches de *S. thermophilus* en possèdent et aucune activité BSH n'a été détectée chez *L. lactis* (Kim et Lee, 2005 ; Iyer *et al.*, 2010b). Toutefois, d'autres travaux ont indiqué la présence d'activité BSH chez des BL en dehors des bifidobactéries (Vidhyasagar et Jeevaratnam, 2013 ; Bhushan *et al.*, 2017). Une récente étude a montré que plusieurs souches d'espèces lactiques issues de végétaux et de laits fermentés exhibaient une activité BSH qui est certes plus importante chez les espèces d'origine végétale (Ru *et al.*, 2019). Cette variabilité des phénotypes BSH suggère l'acquisition probable du gène *bsh* par TGH.

3.2. Capacité d'adhésion aux cellules intestinales : une caractéristique importante des probiotiques

La condition essentielle permettant de qualifier un microorganisme de probiotique est sa capacité à impacter l'organisme positivement (FAO/WHO, 2002). A ce titre, son efficacité dépend de son temps de résidence au niveau de l'hôte et par conséquent de sa capacité d'adhésion à l'épithélium intestinal.

A l'évidence, les effets immunomodulants des probiotiques prennent tout leur sens dans la muqueuse intestinale car les bactéries adhérentes sont en contact direct avec les cellules immunes de l'épithélium. Il a été démontré que les souches fortement adhérentes présentaient d'importants effets sur le système immunitaire intestinal (Ouweland et Salminen, 2003 ; Oelschlaeger, 2010 ; Kang et Im, 2015). De même, l'interaction des probiotiques avec l'épithélium intestinal permet d'y limiter l'adhésion des microorganismes pathogènes en les inhibant par production de substances antimicrobiennes et par compétition sur les sites d'adhésion en induisant notamment la sécrétion de mucus (Collado *et al.*, 2009 ; Kechagia *et al.*, 2013). De plus, la capacité d'adhésion des bactéries probiotiques augmenterait la possibilité d'interagir avec l'hôte. Cela peut entraîner une colonisation

temporaire et augmenter leur temps de transit dans l'intestin pour exercer les effets bénéfiques escomptés (Monteagudo-Mera *et al.*, 2019).

Bien que les probiotiques ingérés soient surpassés en nombre par rapport au microbiote intestinal résidant, l'adhésion des probiotiques aux muqueuses de l'hôte peut modifier la balance en leur faveur localement et temporairement (Lahtinen, 2012). Effectivement, d'une manière générale, les probiotiques semblent être incapables de coloniser l'intestin de façon durable, au vu du déséquilibre de force avec le microbiote résidant, il est donc plus judicieux de parler de durée de persistance au lieu de colonisation. Néanmoins, un apport massif et régulier de probiotiques peut augmenter leur temps de séjour (Ouweland et Salminen, 2003 ; Olivares *et al.*, 2006 ; Monteagudo-Mera *et al.*, 2019). Leur adhésion est également plus pertinente au niveau de l'intestin grêle où la population microbienne locale est moins importante que celle dans le côlon.

Par ailleurs, la capacité d'adhésion des probiotiques est espèce et souche dépendante. *Lb. rhamnosus* GG est connue pour sa forte adhésion aux cellules intestinales, alors que ce n'est pas le cas de plusieurs souches de *S. thermophilus* (*S. thermophilus* LMD-9 ou LMG18311) et pourtant il s'agit bien là encore d'une « espèce » probiotique, notamment, en référence à l'allégation santé attribuée au yaourt (Lebeer *et al.*, 2012 ; Junjua *et al.*, 2016 ; Fernandez *et al.*, 2018). Cela suggère que certains probiotiques ne font que transiter à travers le TGI en exerçant leurs effets positifs sur l'hôte sans pour autant adhérer à l'épithélium intestinal.

Au regard de ces éléments, il est nécessaire de considérer la capacité d'adhésion des bactéries à l'épithélium intestinal comme une condition préalable favorisant l'effet probiotique notamment dans le contexte d'un effet directement lié aux cellules intestinales. La caractérisation de l'adhésion s'inscrit d'ailleurs dans les conditions fonctionnelles de sélection de souches probiotiques exigées dans les lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques destinés à l'alimentation humaine par le comité d'experts de la FAO et de l'OMS (FAO/WHO, 2002), et qui sont toujours d'actualité.

3.2.1. Épithélium intestinal : siège de l'adhésion

Avant d'aborder les mécanismes d'adhésion et les modèles d'étude de celle-ci, il convient de décrire le siège des opérations d'adhésion bactéries-hôte, à savoir l'épithélium intestinal qui est le revêtement de surface de la muqueuse, directement en contact avec la lumière intestinale. Il consiste en une monocouche de cellules épithéliales dont la base repose sur une matrice extracellulaire et un tissu conjonctif de la muqueuse, riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques, que l'on appelle lamina propria (Scoville *et al.*, 2008).

Étant donné sa fonction première l'absorption des nutriments, l'épithélium intestinal a évolué en optimisant sa surface par ses replis de la muqueuse et de sa structure en cryptes et villosités, en doigts de gants, qui se projettent dans la lumière intestinale. Les cryptes contiennent des cellules souches, en prolifération et des cellules différenciées de Paneth, alors que les villosités sont chargées de cellules différenciées issues des cellules souches (Marshman *et al.*, 2002). L'épithélium colique est similaire à celui de l'intestin grêle, à l'exception de l'absence de villosités et de cellules de Paneth (Scoville *et al.*, 2008). La paroi intestinale est schématisée dans la figure 06.

Les entérocytes (ou colonocytes dans le côlon) constituent la grande majorité des cellules épithéliales ayant pour principale tâche l'absorption des nutriments. Elles sont hautement différenciées et polarisées comportant des microvillosités au pôle apical. Ces microvillosités, caractérisées principalement par des glycoprotéines membranaires (glycocalyx), constituent la bordure en brosse. Les cellules épithéliales sont liées entre elles par des jonctions intercellulaires responsables de l'intégrité des muqueuses (Pelaseyed *et al.*, 2014).

Il est à noter que les entérocytes sont intercalées par un petit nombre de cellules caliciformes sécrétrices de mucus, endocrines, des cellules M et des cellules de Paneth. Ces dernières résident essentiellement dans les cryptes où elles sont complètement différenciées. Ce sont des cellules à pouvoir bactéricide puisqu'elles sécrètent le lysozyme et des peptides antimicrobiens (défensines). De la même manière, au niveau de l'iléon, les cellules M de la plaque de Peyer, sont impliqués dans la réponse immunitaire en transportant les antigènes vers le tissu lymphoïde. En ce qui concerne les cellules endocrines, elles ont un rôle de régulation digestive et du métabolisme des cellules intestinales à travers les sécrétions d'hormones et de neuropeptides (Artis, 2008 ; Garrett *et al.*, 2010 ; Peterson et Artis, 2014). Quant aux cellules caliciformes, dites « cellules en gobelets », elles ont la caractéristique de sécréter du mucus, elles sont représentées sur l'ensemble de l'épithélium intestinal et se concentrent dans le côlon distal (Pelaseyed *et al.*, 2014).

Le mucus est un hydrogel (95% d'eau) tapissant l'épithélium dans sa globalité (TGI, voies respiratoires et génitales), en l'occurrence intestinal, et dont l'épaisseur varie considérablement le long du TGI, elle est plus importante dans l'estomac, l'iléon terminal et le côlon (Cone, 2009 ; Pelaseyed *et al.*, 2014). Il joue un rôle de lubrifiant (préserve l'intégrité des muqueuses) et de protection contre toute agression provenant de la lumière intestinale. Les principales substances qui composent le mucus sont les mucines, et en plus faibles proportions y figurent des substances antimicrobiennes (IgA, lysozyme), des facteurs de croissance et des lipides (Thornton *et al.*, 2008 ; Fahy et Dickey, 2010 ; Sicard *et al.*, 2017). Les mucines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire, constituées de chaînes glucidiques rattachées au squelette peptidique : apomucine par

des liaisons, en général, O-glycosidiques (Andrianifahana *et al.*, 2006). Il existe deux types de mucines : transmembranaires (ancrées dans la membrane plasmique) et sécrétées. Une vingtaine de mucines sont retrouvées chez l'homme dont sept sont sécrétées dans diverses portions du TGI : MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8 et MUC19 (Thornton *et al.*, 2008 ; McGuckin *et al.*, 2011) (tableau 04). La production continue de mucus, ainsi que son épaisseur, sa composition et sa pénétrabilité sont façonnées par le microbiote intestinal (Fernandez *et al.*, 2018).

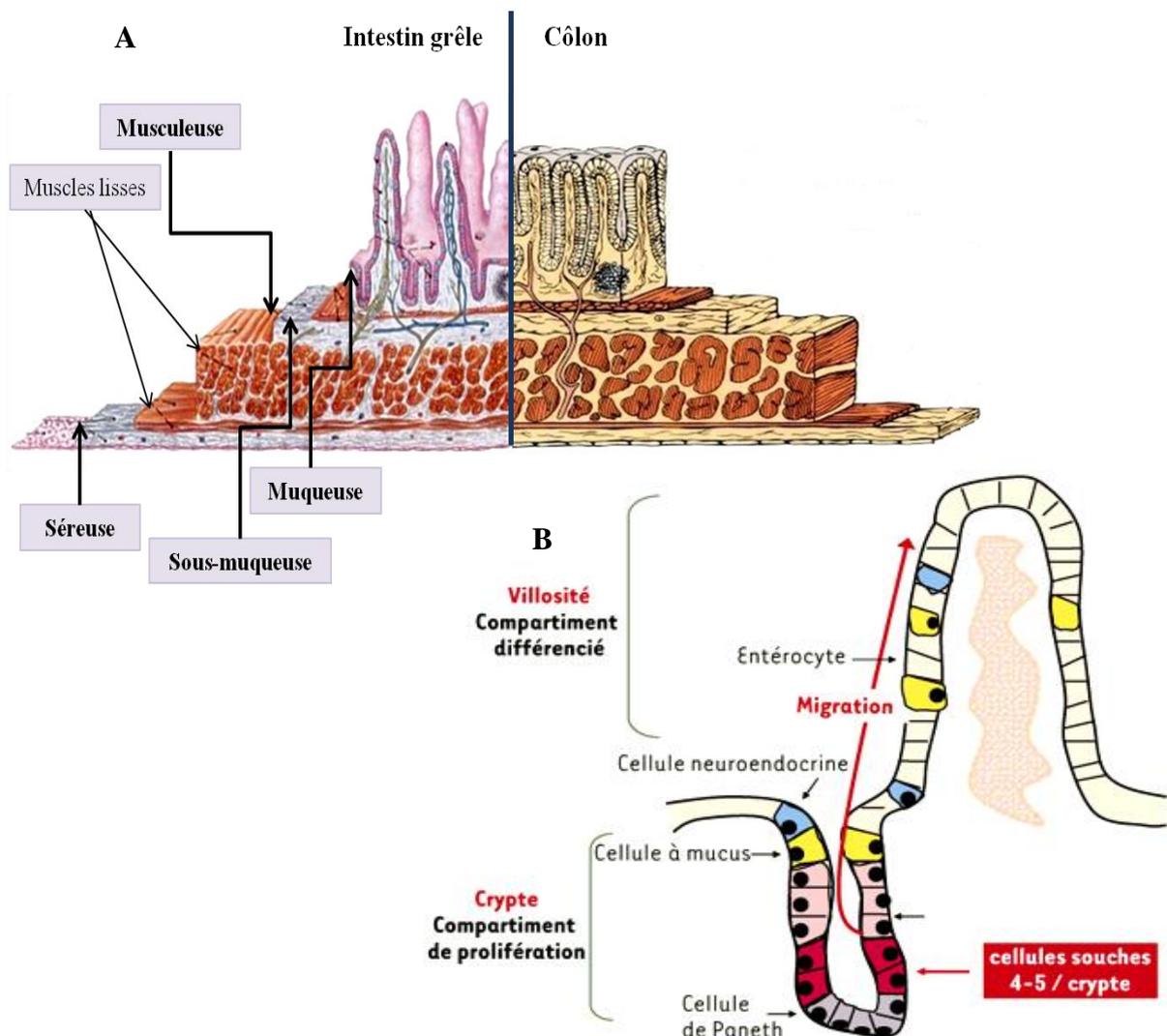


Figure 06. Représentation schématique de l'organisation de la paroi intestinale

A : Tuniques et replis composant l'épithélium intestinal dans le grêle et le côlon (Ducarouge, 2012).

B : Organisation des différentes cellules épithéliales dans les villosité et crypte de l'épithélium intestinal (Andreu *et al.*, 2006).

Tableau 04. Distribution des mucines le long du tractus gastro-intestinal (Andrianifahana *et al.*, 2006 ; McGuckin *et al.*, 2011)

Compartiment du TGI	Mucines transmembranaires	Mucines sécrétées
Cavité buccale	MUC1, MUC4, MUC16	MUC5B, MUC7, MUC19
Œsophage	MUC1, MUC4, MUC20	MUC5B
Estomac	MUC1, MUC16	MUC5AC, MUC6
Intestin grêle	MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17	MUC2
Gros intestin	MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17	MUC2, MUC5AC, MUC6

MUC : mucine

3.2.2. Mécanisme d'adhésion : un processus multifactoriel

L'adhésion bactérienne peut être définie comme étant une caractéristique permettant aux bactéries de se fixer sur une surface donnée, à travers des interactions physicochimiques (électrostatiques, hydrophobes, etc.) et des adaptations physiologiques (Bulard, 2012). De ce fait, et en considérant la surface comme étant l'épithélium intestinal, le processus d'adhésion s'opère en deux étapes. La première, étant instable et réversible, consiste alors en des liaisons faibles entre protéines de surfaces bactériennes et récepteurs épithéliaux et la seconde en est un attachement plus stable et bien consolidé (Van Tassell et Miller, 2011 ; Wang *et al.*, 2015).

A l'évidence, les constituants de surface des bactéries jouent un rôle important dans la détermination de cette adhésion. Chez les bactéries à Gram positif et notamment les BL, les protéines de surface, telles que les protéines ancrées à la paroi et celles de la couche S (*S-layer*), sont particulièrement impliquées dans le processus d'adhésion. Les acides lipotéichoïques (LTA), qui composent la paroi bactérienne et les polysaccharides comme les EPS, en sont tout aussi incriminés. En effet, pour adhérer à l'épithélium intestinal, les bactéries à Gram positif doivent activer la machinerie de protéines de surface parmi lesquelles, celles appartenant à la famille des protéines sortases dépendantes (PSD). Ce sont des protéines ancrées de façon covalente au peptidoglycane de la paroi par un motif C-terminal LPxTG reconnu par les enzymes sortases (SrtA). A titre d'exemple, la protéine MucBP est une PSD possédant un domaine MUB (reconnaissance du mucus) impliquée dans l'adhésion au mucus et aux cellules épithéliales

intestinales chez plusieurs bactéries à Gram positif dont les BL. D'ailleurs, la délétion du gène *mucBP* chez *S. thermophilus* s'est traduite par une diminution du niveau d'adhésion de la souche aux cellules HT29 et HT29-CL16E (Couvigny *et al.*, 2015 ; Kebouchi *et al.*, 2016). Chez les lactobacilles, les protéines les plus courantes favorisant l'adhésion au mucus sont celles qui possèdent des domaines MUB (Van Tassell *et al.*, 2011).

Un autre exemple de PSD est celui des protéases de paroi qui, chez de nombreux streptocoques pathogènes, sont associées à l'adhésion aux surfaces des muqueuses et à la virulence. Ces protéases à sérine sont retrouvées chez les BL avec pour rôle la dégradation des caséines, et qui semblent être également impliquées dans les mécanismes d'adhésion. Exemple de PrtP qui est engagée dans l'adhésion aux surfaces abiotiques et biotiques chez *L. lactis* ainsi que, probablement, chez d'autres BL exprimant une PrtP homologue (Habimana *et al.*, 2007 ; Radziwill-Bienkowska *et al.*, 2014 ; 2017). Pour l'espèce *Lb. rhamnosus*, la protéase ancrée à la paroi (PrtR) contribue à faciliter son adhésion au mucus (Pastar *et al.*, 2003). SrtA peut être aussi considérée comme un facteur d'adhésion puisque son inactivation entraîne la diminution du niveau d'adhésion de *S. thermophilus* aux cellules Caco2-TC7 (Kebouchi *et al.*, 2016), de *Lb. acidophilus* et de *Lb. gasseri* au mucus *in vitro* (Call *et al.*, 2015).

A la surface la plus externe de la paroi bactérienne, les protéines, constitutives (SLP) et associées (SLPA) de la couche S interviennent également avec les récepteurs des cellules de l'hôte. Plusieurs de ces protéines ont été soulignées comme des déterminants de l'adhésion bactérienne aux cellules intestinales et à la matrice extracellulaire *in vitro* tel est le cas pour PrtX (SLPA) chez *Lb. acidophilus* (Johnson *et al.*, 2013 ; 2017) et CbpA (SLP) chez *Lb. salivarius* (Wang *et al.*, 2017).

Dans le même contexte, des structures protéiques exprimées à la surface bactérienne sont impliquées dans le processus d'adhésion, les pili en sont l'exemple le plus couramment décrit dans la virulence et l'adhésion des bactéries pathogènes à l'hôte. Il est à rappeler que les pili sont des appendices composés de sous unités protéiques assemblées et ancrées à la paroi faisant intervenir une famille de sortases (Oxaran David, 2012). Cependant, leur rôle dans l'adhésion aux cellules intestinales est admis chez certains probiotiques. Le rôle du pilus SpaCBA dans l'adhésion au mucus humain, aux cellules épithéliales intestinales et au collagène a été mis en évidence chez l'espèce *Lb. rhamnosus*. Les sous unités SpaB et SpaC constituant le pilus SpaCBA semblent les plus impliquées dans le processus d'adhésion de cette bactérie au mucus intestinal humain (Kankainen *et al.*, 2009 ; Reunanen *et al.*, 2012 ; Guerin *et al.*, 2018).

D'autres constituants et structures de surface non protéiques, à savoir LTA et EPS, peuvent contribuer au processus d'adhésion bactérienne chez certaines souches de BL à travers la formation de biofilms marquant un avantage à la colonisation de l'hôte (Hamon, 2011). La mutation du gène *dltA* s'est traduite par une réduction de la capacité de formation de biofilm et de colonisation du TGI chez une souche de *Lb. reuteri* (Walter *et al.*, 2007). D'autre part, la formation de biofilm est liée à la capacité de *Lb. rhamnosus* GG à produire des EPS (Lebeer *et al.*, 2007). Toutefois, ces derniers peuvent impacter négativement l'adhésion bactérienne aux muqueuses intestinales en masquant les adhésines de surface (Lebeer *et al.*, 2009).

Par ailleurs, un certain nombre de facteurs intracellulaires non associés à la surface bactérienne, sont incriminés dans l'adhésion aux muqueuses. Il s'agit notamment de certaines protéines cytoplasmiques qui peuvent être exportées à la surface cellulaire et agir ainsi sur l'adhésion des bactéries. Ainsi l'implication de la protéine de stress GroEL et le facteur d'élongation EF-TU dans l'adhésion *in vitro* aux cellules intestinales et au mucus a été signalée chez des souches de *Lb. johnsonii* (Vélez *et al.*, 2007a).

3.2.3. Modèles cellulaires : un moyen d'étude de l'adhésion

En raison de la difficulté que présente l'étude de l'adhésion *in vivo*, celle-ci est le plus souvent conduite *in vitro* en utilisant plusieurs techniques dont les plus courantes sont basées sur des modèles de cultures cellulaires mimant l'épithélium intestinal. Ainsi l'évaluation de la capacité d'adhésion des bactéries repose sur l'incubation de celles-ci avec des cellules eucaryotes cultivées sur un support, puis élimination des bactéries non attachées aux cellules et récupération de celles qui ont adhéré pour être dénombrées (Ouwehand et Salminen, 2003).

Parmi les modèles les plus communément utilisés figurent les lignées cellulaires d'adénocarcinome humain Caco-2 et HT29. Elles ont d'abord été utilisées pour l'évaluation des interactions au niveau de l'intestin humain et l'étude de l'absorption, de la sécrétion et du transport par les cellules intestinales. Ensuite, elles ont été étendues à l'étude de l'adhésion bactérienne (Zucco *et al.*, 2005 ; Van Tassell *et al.*, 2011 ; Kamiloglu *et al.*, 2015 ; Jose *et al.*, 2017).

Établies par Fogh *et al.* (1977), les cellules de la lignée Caco-2 présentent la particularité de se différencier spontanément *in vitro* en cellules polarisées exprimant des activités biochimiques caractéristiques des entérocytes de l'intestin grêle, majoritairement présentes dans l'épithélium intestinal. En effet, cultivées sur un support, les Caco-2 évoluent en monocouche, et une fois arrivées à confluence (tapis cellulaire sans interstices), les cellules se différencient et se polarisent avec bordure en brosse au pôle apical et des jonctions cellulaires. Ayant des propriétés

d'entérocytes, les Caco-2 expriment des mucines transmembranaires intestinales exemple de MUC3 et non sécrétées (Rousset *et al.*, 1986 ; Liévin-Le Moal et Servin, 2013 ; Kamiloglu *et al.*, 2015). Cependant, l'absence de mucus dans cette lignée réduit l'étude de l'adhésion aux cellules épithéliales sans tenir compte des interactions avec le mucus.

Par ailleurs, l'hétérogénéité morphologique observée dans les cellules parentales a motivé la sélection de plusieurs clones, tels que Caco-2/TC7, Caco-2/AQ et Caco-2/15, avec une expression plus élevée des activités de surface cellulaire. Ces clones offrent une meilleure stabilité aux cellules et améliore ainsi leur performances (Pereira *et al.*, 2016).

Comparativement aux Caco-2, les HT29 sont des cellules tumorales hétérogènes essentiellement indifférenciées en culture (Gagnon *et al.*, 2013). Toutefois, cette lignée offre la possibilité d'induire des différenciations selon les conditions nutritionnelles et de culture (présence ou absence de glucose, agents chimiques) qui se déclinent en plusieurs modèles tels que HT29-19E, HT29-D4, HT29.74, HT29-MTX, HT29-CL16E ou encore HT29-FU (Liévin-Le Moal et Servin, 2013). Pour l'étude de l'adhésion, les lignées HT29-MTX et HT29-CL16E; semblent être les plus intéressantes. Elles sont issues de l'adaptation des HT29, respectivement, aux méthorexate et butyrate de sodium conduisant à leur entière différenciation en cellules caliciformes sécrétrices de mucus. La différence majeure entre les deux lignées réside dans le type de mucus produit qui se compose principalement de mucines gastriques pour HT29-MTX (MUC5AC) et intestinales (MUC2) pour HT29-CL16E (Augeron et Laboisse, 1984 ; Lesuffleur *et al.*, 1990 ; 1993). Les caractéristiques de ces lignées, en particulier la prédominance de mucus de différentes origines gastro-intestinale, renforcent leur exploitation dans l'étude de l'adhésion bactérienne.

Des modèles de co-cultures sont également développés en vue de simuler davantage les conditions de l'épithélium intestinal, en y intégrant plus d'un type cellulaire, tel que le modèle Caco-2/HT29-MTX. La combinaison d'autres modèles avec des propriétés complémentaires permet ainsi d'étudier l'adhésion bactérienne (Guri *et al.*, 2013 ; Pereira *et al.*, 2016).

Bien que ce soit long à mettre en place, ces modèles cellulaires présentent l'avantage d'être simple d'utilisation. L'origine adénomateuse de ces cellules les rend peut-être différentes des cellules saines, nécessitant l'interprétation des données obtenues avec précaution (Perreault et Beaulieu, 1998 ; Ouwehand et Salminen, 2003 ; Pereira *et al.*, 2016).

*Principales conclusions
dégagées de la revue
de littérature*

A travers cette revue de littérature, nous avons mis la lumière sur l'intérêt de s'intéresser à des laits fermentés traditionnels et comment la fermentation spontanée et les conditions de fabrication seraient à l'origine du développement de souches autochtones. En effet, ce procédé ancestral a traversé les âges et a été préservé jusqu'à présent. Cela ne doit pas être le fruit du pur hasard, sa persistance a plutôt été nourrie par son important rôle dans la conservation du lait et les vertus « thérapeutiques » qu'on reconnaissait à ces produits et qui se confirment actuellement.

Parmi les espèces représentées dans ces produits, nous nous sommes intéressés à *S. thermophilus*. Elle est utilisée depuis 10 000 ans avec le début de la fabrication des produits laitiers fermentés et elle demeure à ce jour largement utilisée en industries laitière, d'ailleurs, la définition officielle du yaourt exige la présence de *S. thermophilus*. C'est une espèce inoffensive, reconnue GRAS avec des propriétés technologiques et probiotiques de plus en plus documentées.

Une autre espèce du genre *Streptococcus* s'est imposée dans les produits laitiers, il s'agit de *S. macedonicus*. Elle est fréquemment isolée de fromages et de laits fermentés de par le monde. Les preuves de sa non-pathogénie continuent d'être rapportées par les études la distinguant de ce fait, des autres espèces de ce genre. Elle présente par ailleurs, des propriétés technologiques et probiotiques intéressantes qui méritent d'être exploitées davantage d'où notre intérêt pour cette espèce.

L'exploration du potentiel probiotique passe par l'évaluation des pré-requis nécessaires à l'exercice de ce potentiel. Nous avons traité dans cette revue, les principaux critères que doivent posséder les probiotiques à savoir la résistance aux conditions simulées du TGI et la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales. Il en ressort à travers la littérature, la place de ces conditions dans le contexte de la définition des probiotiques et l'intérêt de les explorer pour la sélection de souches probiotiques.

Matériel
et
Méthodes

Le présent travail vise dans un premier temps la sélection des souches de *S. thermophilus* et *S. macedonicus* dans des laits fermentés traditionnels algériens. Une identification phénotypique et génotypique des isolats ainsi qu'une identification de leur capacité d'acidification permettent une première caractérisation de ces souches. Ensuite, dans un deuxième temps, les souches sélectionnées seront caractérisées sur leur capacité à résister aux environnements simulant les conditions du TGI et à adhérer aux cellules épithéliales intestinales *in vitro* en vue d'établir leurs principaux pré-requis à un éventuel potentiel probiotique.

1. Sélection des souches de *Streptococcus thermophilus* et *Streptococcus macedonicus*

1.1. Collecte des échantillons

Les échantillons de laits fermentés proviennent de la région de Constantine, située au Nord-Est de l'Algérie (figure 07). Largement consommés dans la région, *lben* et *rayeb* sont les principaux laits fermentés traditionnellement fabriqués. Ces produits sont généralement destinés à une consommation familiale au niveau des fermes ou à la vente au marché local par des laitiers. Ces derniers adoptent le mode de fabrication traditionnel en utilisant comme matière première des laits de mélange issus de plusieurs fermes, la coagulation du lait cru se fait spontanément grâce à la flore endogène du lait, mais aussi environnementale. Cette variété de la matière première et des conditions de fermentation confèrent au produit fini une plus grande diversité de la flore microbienne. La probabilité de sélectionner des souches différentes dans ces produits nous semble alors plus élevée.

Quarante échantillons de laits fermentés (17 *Lben* et 23 *Rayeb*) ont été ainsi collectés dans 12 fermes et auprès de 13 laitiers durant la période de juin à septembre 2013. Les prélèvements ont été effectués dans des flacons stériles de 200 mL et acheminés à +4°C dans un sac isotherme au laboratoire Alimentation, Nutrition et Santé (ALNUTS), localisé au niveau de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA) de l'Université Frères Mentouri Constantine 1.

L'analyse microbiologique des échantillons a été réalisée dans un délai de 24 heures maximum après prélèvement.

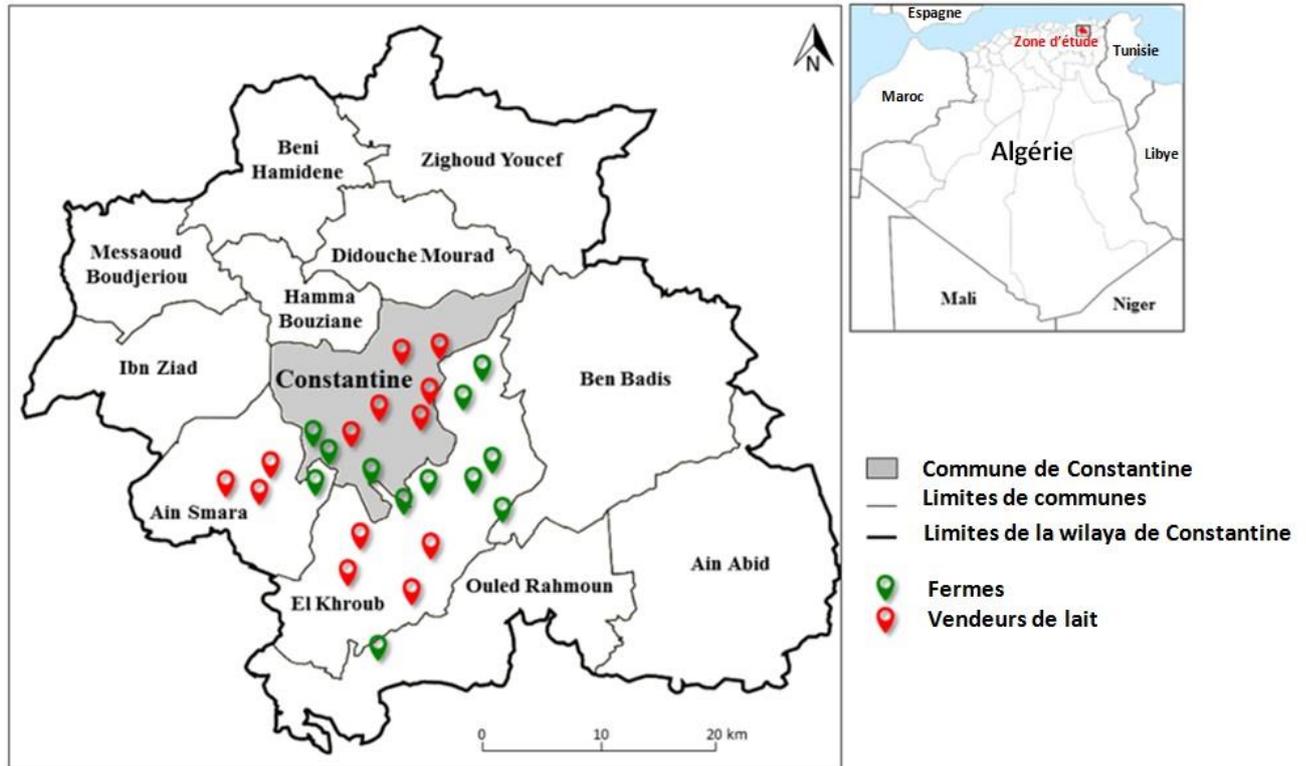


Figure 07 Points de collecte des produits laitiers fermentés

1.2- Isolement et identification phénotypique des isolats

En vue d'isoler des streptocoques lactiques thermophiles, une série de dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-7} a été réalisée pour chaque échantillon dans de l'eau peptonée (oxoid). Un volume de 0,1 mL de la dilution appropriée est ensuite étalé sur gélose M17 supplémentée de 20 g/L de lactose (L) (Terzaghi et Sandine, 1975) (annexe 01). Après incubation à 42°C pendant 24 à 48 heures, une vingtaine de colonies distinctes issues de cultures dénombrables est prélevée. Ces colonies ont été purifiées par repiquages successifs sur gélose LM17 dans les mêmes conditions sus-citées. Les isolats ainsi purifiés ont été distingués par la coloration de Gram et la recherche de la catalase.

1.2.1. Coloration de Gram

Les isolats précédemment purifiés ont été différenciés selon leur type de coloration, leur morphologie cellulaire et leur mode de regroupement par la coloration de Gram (annexe 02). Les frottis préparés à partir de cultures jeunes sont séchés puis colorés selon la technique décrite par Gram (1884).

L'observation microscopique est faite à l'aide d'un microscope photonique (Motic modèle 18-28) et permet ainsi de retenir parmi nos isolats, les coques à Gram positif.

1.2.2. Recherche de la catalase

Il est à souligner que le test de la catalase ainsi que tous les tests phénotypiques lui faisant suite ont été effectués selon Guiraud (2003).

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et oxygène (O_2). L'absence de cette enzyme représente une des clés d'identification des bactéries lactiques puisque elles en sont dépourvues. De ce fait, seuls les isolats ne présentant pas d'activité catalase sont retenus à ce stade de la sélection.

La recherche de la catalase a été réalisée en mettant en contact une colonie pure avec de l'eau oxygénée à 10 volumes. La formation de bulles de gaz engendrées par le dégagement d' O_2 indique une activité catalase.

1.2.3. Dégradation de l'esculine

L'hydrolyse de l'esculine par une esculinase se traduit par un noircissement du milieu révélé par le citrate de fer. Cette méthode permet d'orienter la sélection en éliminant les entérocoques (esculinase positive) qui sont prédominants dans les produits laitiers traditionnels. Pour se faire, une colonie pure de chaque isolat à Gram positif et catalase négative a été repiquée sur gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium (BEA – annexe 01) par la méthode des stries, puis incubée à 42°C pendant 24 heures.

Les isolats présumés esculinase négative sont ainsi retenus.

1.2.4. Croissance dans des milieux de culture hostiles (pH 9,6 et 6,5% de NaCl)

Le bouillon LM17 a été ajusté à pH 9,6 avec une solution de NaOH (1N). Ensuite, un volume de 9 mL de bouillon est inoculé avec une colonie pure de chaque isolat testé, puis incubé à 42°C pendant 24 à 48 heures.

La tolérance au sel a été estimée dans les mêmes conditions en utilisant le bouillon LM17 supplémenté à 6,5% (p/v) de NaCl.

Après incubation, la croissance bactérienne se manifeste par l'apparition d'un trouble dans le bouillon. Les isolats n'ayant engendré aucun trouble sont retenus pour la suite de l'identification.

Cette étape d'identification permet d'affiner la sélection en excluant les entérocoques et en se rapprochant des caractères présomptifs des streptocoques recherchés (incapacité de croissance à pH 9,6 et à 6,5% (p/v) de NaCl).

1.2.5. Conservation des isolats

Les isolats présentant les caractéristiques générales des espèces recherchées ont été retenus pour une identification génétique. Ils ont été conservés à +4°C sur gélose LM17 avec un renouvellement des cultures toutes les 3 semaines et à -20°C dans du lait écrémé reconstitué à 10% (p/v). Le lait étant cryoprotecteur est parfaitement adapté pour la conservation des BL. Une colonie pure est alorsensemencée dans 10 mL de lait écrémé reconstitué et incubée à 42°C jusqu'à coagulation, ensuite la culture est répartie dans des tubes eppendorf puis conservée à -20°C (Galia, 2016).

1.3. Identification génotypique des isolats

Les isolats retenus sur la base des critères phénotypiques ont été identifiés au niveau moléculaire (figure 08).

L'ADN génomique de chaque isolat a été extrait et amplifié puis séquencé. L'analyse de la séquence codante du gène de l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) a été ensuite effectuée permettant une identification au stade de l'espèce.

La variabilité entre les isolats a été investiguée par l'analyse des séquences de l'espace intergénique ITS (16S-23S) et du gène *sodA*, ainsi que par les méthodes RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) et MLST (*Multi Locus Sequence Typing*).

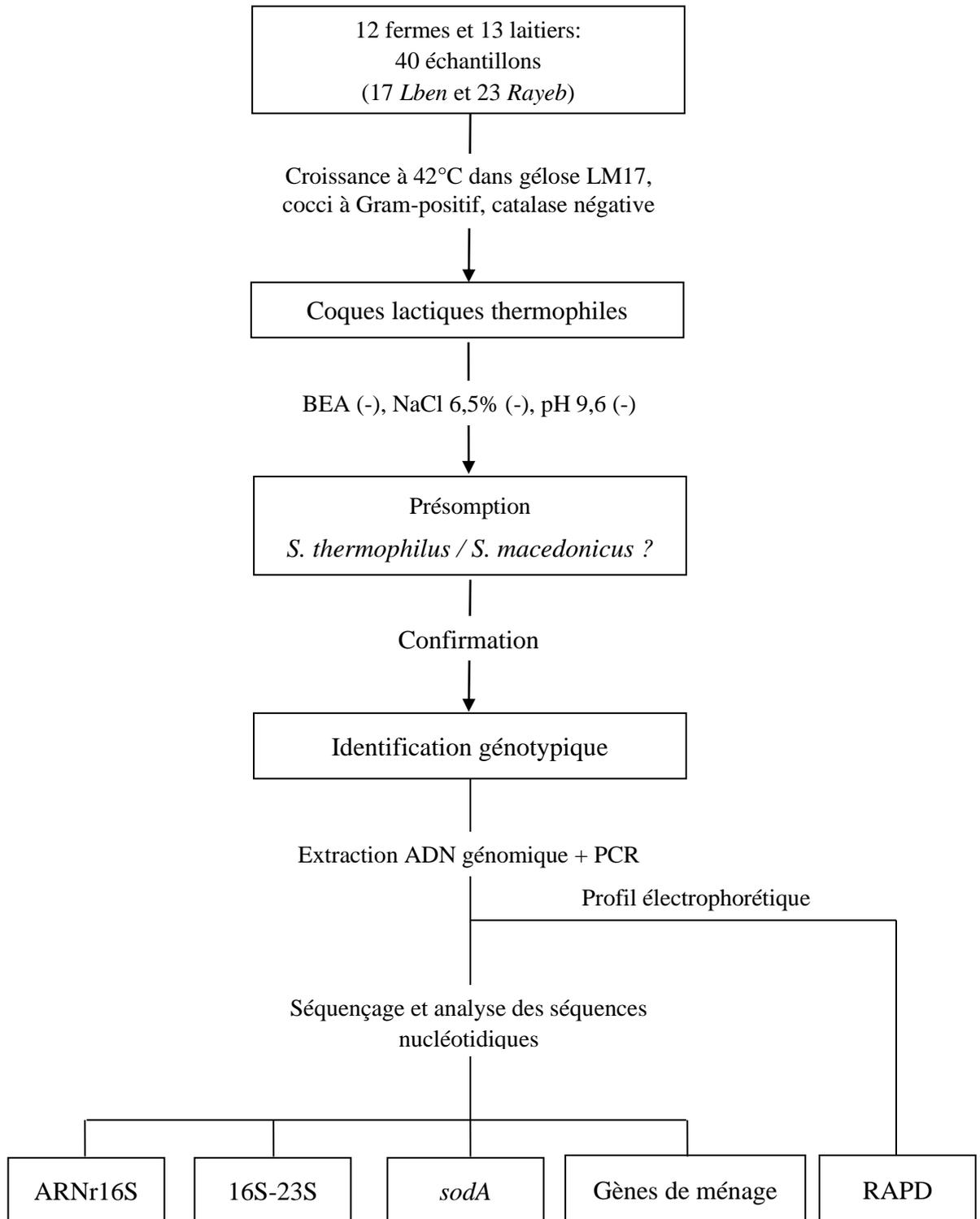


Figure 08. Schéma de la sélection de *S. thermophilus* et *S. macedonicus*

(-) croissance négative

1.3.1. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique pour l'ensemble des isolats sélectionnés a été réalisée selon le protocole de Colmin *et al.* (1991) adapté par Galia *et al.* (2009).

Le principe de la technique consiste en une lyse des cellules, suivie d'une déprotéinisation par précipitation. L'ARN est ensuite éliminé par un traitement enzymatique, et l'ADN est enfin récupéré par précipitation.

Chaque isolat est cultivé dans 50 mL de bouillon LM17 puis incubé à 42°C pendant 24 heures. Les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation à 3 900 g et à 4°C pendant 10 minutes. Les culots sont lavés deux fois avec 5 mL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, acide Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) 8 mM à pH 8) avant d'être resuspendus dans 5 mL de tampon TE. Ensuite, 250 µL de lysozyme (Roche, 5% p/v) sont ajoutés dans le but de lyser la paroi bactérienne. Après 1 heure d'incubation à 37°C, 600 µL d'EDTA (0,5 M à pH 8) et 50 µL de protéinase à 2% p/v K (Roche) sont rajoutés. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 15 minutes, puis 660 µL d'une solution de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 10% (p/v) y sont additionnés. L'ensemble est de nouveau incubé à 50°C pendant 1 heure 30 minutes avec agitation jusqu'à lyse cellulaire.

Le lysat ainsi obtenu est réparti en fractions de 1 mL dans des tubes eppendorf, puis mélangé avec 350 µL d'acétate de potassium (5 M acide acétique, 3 M acétate de potassium) à 4°C. Ensuite, les tubes sont placés pendant 10 minutes dans la glace, puis centrifugés 15 minutes à 13 000 g à 4°C. A l'issue de cette étape, les protéines sont éliminées par précipitation et les acides nucléiques récupérés dans le surnageant. A celui-ci, ont été ajoutés 5 µL de RNase A à 1% p/v (Roche) afin d'éliminer les ARN.

Après une heure d'incubation à 37°C, 1 mL d'isopropanol est ajouté provoquant la précipitation de l'ADN génomique. L'ensemble est homogénéisé par retournement, puis centrifugé 10 minutes à 4°C et à 13 000 g. Le culot d'ADN obtenu a ensuite été lavé avec l'éthanol à 70% (v/v), séché, puis resuspendu dans 50 à 100 µL d'eau ultra pure.

La qualité et la concentration de l'ADN génomique extrait sont évaluées par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm dans un spectrophotomètre de la marque Eppendorf. Un ratio A_{260}/A_{280} compris entre 1,8 et 2 indique un taux de pureté élevé de l'ADN extrait. Une contamination protéique de l'ADN est supposée lorsque ce ratio est inférieur à 1,8 et quand il est supérieur à 2, cela indique une contamination de l'ADN par l'ARN (Gallagher et Desjardins, 2006). Pour évaluer la concentration en ADN, une dilution 1/100 d'ADN génomique est réalisée

et l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre (Eppendorf) à 260 nm. 1 U.A. correspond à 50 µg/mL d'ADN double-brin.

1.3.2. Amplification des gènes par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'amplifier *in vitro* de façon exponentielle la séquence du gène d'intérêt moyennant une ADN polymérase. Les conditions générales de la PCR consistent à soumettre un milieu réactionnel (ADN, amorces spécifiques, enzyme polymérase et désoxyribonucléotides libres) à des cycles de températures réitérés (dénaturation, hybridation et élongation).

Dans ce travail, toutes les PCR ont été réalisées dans un volume final de 20 µL du milieu réactionnel composé de : 1 µL d'ADN génomique (100 ng), 2 µL de tampon de PCR 10X (Fermentas), 1,2 µL de MgCl₂ (Fermentas, à 50 mM), 0,4 µL de dNTP (Biorad, à 10 mM), 1 µL de chaque amorce (Eurogentec, diluées au préalable à 10 µM), 0,1 µL de Taq polymérase (Invitrogen, à 5unités) et d'eau ultra pure (pour ajuster le volume final à 20 µL).

Les différentes séquences des amorces utilisées pour amplifier les différents gènes ont été soit puisées de la littérature ou dessinées à partir du génome de *S. macedonicus* ACA-DC 198 (Papadimitriou *et al.*, 2012), à l'aide du programme Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). La pertinence de ces amorces a été validée par des tests *in silico* (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) ; elles ont été synthétisées par la société Eurogentec à 100 µM.

Les réactions de polymérisation ont été effectuées dans un thermocycleur My Cycler (Eppendorf) selon les programmes détaillés ci-après.

Tableau 05. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des différents gènes par réaction PCR

Gène	Amorces	Séquence des amorces	Taille d'amplicon (pb)	Température d'hybridation (°C)
ARNr 16S	SSU-for	TGCCAGCAGCCGCGGTA	900	55
	SSU-rev	GACGGGCGGTGTGTACAA		
ITS 16S- 23S	ITS 16S	TTGTACACACCGCCCGTCA	600	54
	ITS 23S	GGTACCTTAGATGTTTCAGTTC		
<i>sodA</i>	sodA-for	CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC	450	37
	sodA-rev	ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC		

1.3.2.1. Amplification des gènes codant l'ARNr 16S

Reconnue comme une méthode de référence pour identifier rapidement des espèces de BL, la séquence du gène de l'ARNr 16S obtenue a été analysée pour tous les isolats retenus suite à la sélection phénotypique.

L'amplification du gène codant l'ARNr 16S a été réalisée par PCR dans les conditions précédemment décrites en utilisant des amorces universelles : SSUfor et SSUrev (tableau 05) (Dufour *et al.*, 2008). Les réactions ont été conduites selon les étapes suivantes : dans un premier temps, les brins d'ADN sont séparés à 94°C pendant 4 minutes, s'ensuivent trente cycles d'amplifications. Chaque cycle est constitué d'une phase de dénaturation de 30 secondes à 95°C, puis d'une hybridation des amorces de 30 secondes à la température de 55°C, et d'une élongation à 72°C pendant 1 minute. Enfin une étape supplémentaire d'élongation d'une durée de 10 minutes à 72°C est programmée pour achever la polymérisation totale de l'ADN (Dufour *et al.*, 2008).

1.3.2.2. Amplification des séquences intergéniques 16S-23S

Les séquences des régions intergéniques 16S-23S sont utilisées pour l'identification des bactéries au niveau de l'espèce et de la souche. Le séquençage de ces régions hypervariables permet, de ce fait, de confirmer et de compléter le résultat obtenu avec les séquences du gène de l'ARNr 16S et de discriminer les souches entre elles.

Ces séquences ont été amplifiées avec les amorces ITS 16S et ITS 23S (tableau 05) décrites par Kostman *et al.* (1992) et (Dufour *et al.* (2008) dans les conditions suivantes : pré-dénaturation à 94°C pendant 4 minutes ; puis 30 cycles de dénaturation à 94°C durant 30 secondes, d'hybridation à 54°C pendant 30 secondes, et 45 secondes d'élongation à 72°C ; enfin d'une extension finale de 10 minutes à 72°C.

2.3.2.3. Amplification des séquences du gène *sodA*

Sur la base de sa spécificité aux streptocoques, le séquençage du gène *sodA* permettrait de mettre en évidence des divergences possibles entre les souches au sein de la même espèce.

Les amorces dégénératives *sodA*-for et *sodA*-rev ont été employées pour amplifier le fragment interne du gène codant la superoxyde dismutase *sodA* selon le diagramme de température suivant : pré-dénaturation à 95°C pendant 3 minutes ; s'en suivent 30 cycles de dénaturation de 30 secondes à 95°C, puis 30 secondes d'hybridation à 37°C et 45 secondes d'élongation à 72°C, et enfin une extension finale de 10 minutes à 72°C (Poyart *et al.*, 2002).

1.3.2.4. Amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD-PCR)

La méthode RAPD-PCR a été appliquée aux isolats de cette étude en vue de déceler une éventuelle variabilité génétique. L'amplification aléatoire d'ADN génomique polymorphe par l'utilisation de l'amorce XD9 (5'-GAAGTCGTCC-3') (Moschetti *et al.*, 1998) a été réalisée dans les conditions standards de PCR (section 1.3.2).

Les paramètres du cycle PCR sont les suivants : pré-dénaturation à 94°C pendant 4 minutes ; puis 40 cycles de dénaturation à 94°C durant 1 minute, une hybridation à 31°C pour 1 minute, et une élongation à 72°C pendant 2 minutes; enfin une extension finale de 7 minutes à 72°C pour achever la polymérisation (Blaiotta *et al.*, 2011).

Plusieurs essais ont été effectués, en variant certains paramètres (concentrations d'ADN, température d'hybridation), et qui se sont révélés infructueux, notamment en termes de reproductibilité. Le recours à une autre méthode de typage (MLST) s'est avéré donc nécessaire.

1.3.2.5. Amplification des fragments internes de gènes de ménage (MLST)

La technique MLST a été réalisée selon les protocoles de Delorme *et al.* (2007 ; 2010), El-Sharoud *et al.* (2012), Shibata *et al.* (2014) et Junjua *et al.* (2016), afin d'estimer la diversité génétique entre les souches de la même espèce.

Les amorces utilisées pour l'amplification des fragments internes des gènes de ménage *ddlA*, *pepO*, *glcK*, *ilvC*, *thrS*, *tkl*, *dnaE*, *pyrE* et *serB*, ont été puisées des travaux sus-cités adaptés par Junjua *et al.* (2016) en ce qui concerne l'espèce *S. thermophilus*.

Par ailleurs, pour *S. macedonicus*, les amorces ont été spécifiquement dessinées sur la base du génome de la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 (Papadimitriou *et al.* 2012) avec le programme Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Quant aux gènes *dpr*, *gmk*, *rpoD*, *parC*, *pta*, *pyrC* et *recN*, ils ont été amplifiés par les amorces de Shibata *et al.* (2014). Les séquences des différentes amorces utilisées dans le schéma MLST ainsi que la taille des amplicons attendus et la température d'hybridation sont indiquées dans les tableaux 06 et 07

Le protocole d'amplification de tous ces gènes a été précédemment décrit (section 1.3.2). Le diagramme du cycle de température pour les réactions PCR des gènes *ddlA*, *pepO*, *glcK*, *ilvC*, *thrS*, *tkl*, *dnaE*, *pyrE* et *serB* correspond à celui de Delorme *et al.* (2007) : pré-dénaturation de 5 minutes à 94°C, suivi par 30 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 50°C (55°C pour *S. macedonicus*), et 1 minute à 72°C, extension finale de 10 minutes à 72°C.

L'amplification des gènes de ménage *dpr*, *gmk*, *rpoD*, *parC*, *pta*, *pyrC* et *recN* a été menée dans les conditions de Shibata *et al.* (2014) selon le diagramme suivant : pré-dénaturation à 94°C pendant 1 minute, suivi par 30 cycles de 45 secondes à 94°C, 45 secondes à 55°C, et 45 secondes à 72°C, extension finale de 5 minutes à 72°C.

1.3.3. Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR

Les produits d'amplification de la PCR obtenus sont révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (p/v) et à 1,5% pour la RAPD. La taille des fragments est estimée par comparaison à un marqueur de taille EZ-Load 100 bp (BioRad) et GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoScientific).

Pour cela, 4 µL de produit de PCR est mélangé avec 1 µL de tampon de dépôt 5X composé de 0,25% (p/v) de bleu de bromophénol, de 70% (p/v) de saccharose et de 0,1 M d'EDTA à pH 8. Ensuite, une migration horizontale est réalisée sur un système d'électrophorèse Mupid® One (Eurogentec) en tampon TAE 0,5X (acétate de Tris 40 mM, EDTA 1 mM) sous une tension de 100 volts pendant 30 minutes (130 volts pendant 2 heures pour la RAPD).

Les bandes électrophorétiques sont visualisées à 254 nm avec un système GelDoc (BioRad) après immersion du gel dans une solution contenant 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium pendant une dizaine de minutes et rinçage à l'eau distillée.

Tableau 06. Séquences des amorces et fonctions des gènes du schéma MLST

Gène	Amorces	Séquence (5' - 3')		Fonction du gène
		<i>S. macedonicus</i>	<i>S. thermophilus</i>	
<i>glcK</i>	glcK-for	GGGATTGACCTTGGTGGGAC	TGGGCAGAACTCAAGAA	Glucose kinase
	glcK-rev	AAGACTTGCTGCACCGATGA	AACACCACCACCGATAAC	
<i>ddlA</i>	ddlA-for	CTGAGAGTGTTCATGCGTGCG	TCAAGTGTAGCTATGGAC	D-alanine D-alanine ligase
	ddlA-rev	ATGGCTTTCGCGTTTTTCAA	GTAGATGGCTCCATCCTC	
<i>pepO</i>	pepO-for	CCACATTGGGTCTCCTGCTT	AACTCTACCACCCATATGA	Endopeptidase
	pepO-rev	GGCGCCAAATGCAAGAAGAA	GGTTTATTCCACTTGCTCCAG	
<i>ilvC</i>	ilvC-for	TGGTTATGGCTCACAAAGTCA	ATACAGGTCACGATGTTAT	Kétol acide réductoisomérase
	ilvC-rev	TGAATGCGTCGTCATCGTTT	GGTGCATATCCAGCTTCAGT	
<i>thrS</i>	thrS-for	TGGACCGTAAAAGGCTGCTT	ATCACTGAAGATGGAAGC	Thréonyl-ARNt synthétase
	thrS-rev	CCTGACCACGAAGATGCACT	CCAAGTTTACGGTGGTCA	
<i>tkt</i>	tkt-for	CAGGACATGGTTCTGCCCTT	CTGGCCACCCTGGTGTGG	Transcétolase
	tkt-rev	CGTGAGTTGGTCCGTCTTCA	GGAGCACCGTGAACACCG	
<i>pyrE</i>	pyrE-for	TCACAAATTGCATCAGATTTGCT	CGCTTTACGGAGGAACAT	Orotate phosphoribosyltransférase
	pyrE-rev	TCACGCCAAGTTTCTTGATTTTCT	GTCCGTCTGCAGTGATGT	
<i>dnaE</i>	dnaE-for	GTCAGACCTCTATCCACGCG	GGACTGGGAGCCTGGGAT	ADN-polymérase III
	dnaE-rev	CGCAAATAGACTCCCGAGCT	ACTCCCTGCAGCAGACCC	
<i>serB</i>	serB-for	TGGTAAGGCGCTTCTTTTCG	GGTCCAAGAAGAAGTAATTGA	Phosphosérine Phosphatase
	serB-rev	TGGATGTGGACTCTACCCCTCA	GACCTTATACAAATCTGGTT	
<i>Dpr</i>	dpr-for	CCAAGCGGTTGCTGATTTGTC		Protéine de résistance au peroxyde
	dpr-rev	ATTTGATTCTGGTGTGTTGCC		
<i>Gmk</i>	gmk-for	CCGTTTCTATGACAACACGCC		Guanylate kinase
	gmk-rev	CGTCCGATAACACGATCAACA		
<i>rpoD</i>	rpoD-for	CGGACAAAGAAGGAAATCCATC		Facteur sigma de l'ARN-polymérase
	rpoD-rev	GTTTCAACCATGTGAACAGGA		
<i>parC</i>	parC-for	TGGCTTGAAGCCTGTTCAAC		Sous-unité A de l'ADN-topoisomérase IV
	parC-rev	TCAATGAGGTAAACAACCGC		
<i>Pta</i>	pta-for	TGTTTGCTGACTGTGCGATT		Phosphate Acétyltransférase
	pta-rev	CCATCAATAGCTTGAGCAGCT		
<i>pyrC</i>	pyrC-for	GGCTTTGATCAGGTTGCAGA		Dihydratase
	pyrC-rev	GGTCTTCTTCGTGAACGGCAA		
<i>recN</i>	recN-for	AGGGAAATTCAATCGTGATGGC		Protéine de réparation de l'ADN
	recN-rev	TCTTCAAAGTTCGCGAGCTTG		

Tableau 07. Tailles d'amplicons attendues dans les réactions PCR pour étude MLST

Amorces	Taille d'amplicon (pb)	
	<i>S. macedonicus</i>	<i>S. thermophilus</i>
glcK-for / glcK-rev	930	488
ddlA-for / ddlA-rev	968	472
pepO-for / pepO-rev	1200	583
ilvC-for / ilvC-rev	900	476
thrS-for / thrS-rev	1150	518
tkf-for / tkf-rev	1160	571
pyrE-for / pyrE-rev	614	546
dnaE-for / dnaE-rev	1100	491
serB-for / serB-rev	562	498
dpr-for / dpr-rev	431	
gmk-for / gmk-rev	480	
rpoD-for / rpoD-rev	460	
parC-for / parC-rev	480	
pta-for / pta-rev	487	
pyrC-for / pyrC-rev	499	
recN-for / recN-rev	455	

For : forward, rev : reverse

1.3.4. Purification des produits de PCR

Les amplicons sont purifiés par un kit de purification (Roche Applied Science, Meylan, France) conformément aux recommandations du fabricant.

Pour cela, chaque tube de PCR, contenant les produits de PCR, est ajusté à 100 µL avec de l'eau ultra pure. Un volume de 500 µL du tampon de ligation (*binding buffer* : 3 M guanidine-thiocyanate, 10 mM Tris-HCl, 5% (v/v) éthanol, pH 6,6) est alors ajouté à chaque tube.

L'ensemble est mélangé puis transféré dans un tube à filtre (inséré dans un tube collecteur ou colonne) pour être centrifugé à 13 000 g pendant 60 secondes. L'ADN reste accroché au filtre et la solution résiduelle est éliminée.

Un volume de 500 µL de tampon de lavage (*wash buffer* : 80% (v/v) éthanol, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) est ajouté dans le tube à filtre qui est ensuite centrifugé à 13 000 g pendant 60 secondes. La solution est jetée et le filtre est récupéré pour un deuxième lavage de l'ADN dans les mêmes conditions avec 200 µL de tampon de lavage.

Le filtre est ensuite inséré dans un tube Eppendorf propre qui reçoit 20 µL d'eau ultra pure. Après centrifugation dans les conditions précédemment décrites, l'ADN est alors élué.

La qualité et la concentration de l'ADN sont vérifiées par mesure spectrophotométrique (spectrophotomètre, eppendorf) de l'absorbance à 260 nm et 280 nm, qui renseignent sur la pureté et la concentration de l'ADN.

1.3.5. Séquençage

Les amplicons purifiés ainsi que les amorces ayant servies aux réactions de PCR (à la concentration de 50 mM) ont été envoyés à la société Beckman Coulter Genomics (<https://myproject.beckmangenomics.com/myp/home?siteid=col&mapid=home>) en France pour séquençage. Celui-ci est réalisé selon la méthode de Sanger (1977) qui permet de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN.

1.3.6. Analyse des séquences nucléotidiques

1.3.6.1. Alignement avec les séquences nucléotidiques des banques de données biologiques

Le traitement des séquences nucléotidiques pour l'ensemble des gènes analysés (gène codant l'ARNr 16S, ITS, *sodA*, gènes de ménage) a été effectué à l'aide des programmes BLASTn disponibles sur le site : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> et ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>.) Le premier permet de déterminer le pourcentage de similarité des séquences de la souche inconnue avec les séquences de références déposées dans les banques de données (Genbank) et le second est destiné aux alignements multiples des séquences nucléotidiques entre elles.

Concernant l'étude MLST, les séquences de tous les isolats pour chaque locus sont alignées et comparées en utilisant les programmes ClustalW et BLASTn. Les numéros d'allèles sont alors attribués aux séquences uniques de façon arbitraire pour les isolats de *S. macedonicus* et sur la

base des numéros d'allèles existant dans la base de données Genbank et les travaux de Delorme *et al.* (2010) et Junjua *et al.* (2016) pour l'espèce *S. thermophilus*. Un profil allélique est ensuite obtenu pour chaque isolat qui correspond à une série de nombres entiers (10 maximum pour *S. macedonicus* et 9 pour *S. thermophilus*). Le pourcentage de divergence a également été déterminé en tenant compte du nombre de sites variables et de la longueur des séquences pour chaque locus.

1.3.6.2. Etude phylogénétique

L'analyse phylogénétique est réalisée dans le but de visualiser des divergences génétiques entre nos isolats et les souches les plus proches.

Pour *S. thermophilus*. L'arbre phylogénétique a été construit sur la base de séquences concaténées de neuf gènes de ménage (*ddlA*, *pepO*, *glcK*, *ilvC*, *thrS*, *tkl*, *dnaE*, *pyrE* et *serB*) après alignement multiple des séquences de ces gènes correspondant à nos souches et celles des espèces apparentées par le programme ClustalW. La méthode du Neighbor-Joining basée sur le modèle de Tamura-Nei (Tamura et Nei, 1993) a été utilisée pour créer l'arbre sur le logiciel MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) version 7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016). Les séquences des gènes des souches de *S. thermophilus* de la collection de l'Unité de recherche Animal et Fonctionnalité des Produits Animaux (laboratoire URAFFPA, INRA, Université de Lorraine) ont été associées dans la construction de l'arbre (Junjua *et al.*, 2016). Des séquences des souches de l'espèce *S. salivarius* JIM8777, CCHSS3 et 571 ont servi à enraciner l'arbre.

Concernant *S. macedonicus*, une séquence concaténée des dix gènes de ménage variables (*pyrC*, *ilvC*, *pta*, *recN*, *ddlA*, *dpr*, *gmk*, *parC*, *rpoD* et *serB*) a été créée après alignement des séquences avec le programme ClustalW et l'arbre phylogénétique a été construit avec la méthode du maximum de vraisemblance sur la base du modèle Tamura-Nei (Tamura et Nei, 1993). La fiabilité de l'arbre est vérifiée avec un test de *Bootstrap* impliquant 1000 répliques sur le logiciel MEGA7. Des séquences des gènes des souches de l'espèce *S. gallolyticus* UCN34, ATCC43143 et ATCCBAA-2069 ont été utilisées pour enraciner l'arbre.

1.3.7- Numéros d'accèsion des séquences nucléotidiques

Les séquences des allèles de *S. macedonicus* ont été déposées dans la banque de données GenBank sous les numéros suivants : KU873024 (gène *ilvC*, allèle 1), KU873025 (gène *ilvC*, allèle 2), KU873031 (gène *ddlA*, allèle 2), KU873032 (gène *dpr*, allèle 2), KU873033 (gène *gmk*, allèle 2), KU873035 (gène *rpoD*, allèle 2), KU873034 (gène *parC*, allèle 2), KU873026 (gène

pyrC, allèle 1), KU873027 (gène *pyrC*, allèle 2), KU873028 (gène *pta*, allèle 1), KU873029 (gène *pta*, allèle 2), KU873030 (gène *recN*, allèle 2), KU873036 (gène *serB*, allèle 2).

La souche *S. macedonicus* PA a également été déposée dans la collection française de bactéries alimentaires (CIRM-BIA, Rennes, France) sous le numéro d'enregistrement CIRM-BIA 2314.

2. Capacité acidifiante des isolats en lait

La capacité acidifiante de nos isolats en lait a été réalisée selon le protocole de Lombardi *et al.* (2004) avec quelques modifications.

Des pré-cultures des isolats sélectionnés ainsi que la souche *S. thermophilus* LMD-9 (ATCC® BAA-491™), utilisée comme témoin, ont été effectuées dans du lait écrémé reconstitué à 10% (p/v) additionné de bactotryptone à 1% (p/v) (Sigma-Aldrich).

Les pré-cultures sont réalisées par ensemencement des souches congelées dans le lait avec bactotryptone et incubation pendant une nuit à 42°C. Ces pré-cultures ont servi à inoculer à 1% (v/v) le lait écrémé seul et enrichi en bactotryptone, puis elles ont été incubées pendant 8 heures à 42°C.

La capacité de nos isolats à acidifier le lait seul ou enrichi qui se traduit par le niveau de réduction du pH de celui-ci est estimée par des mesures de pH toutes les 30 minutes à l'aide d'un pH-mètre (Jenway modèle 3505).

3. Tests de survie *in vitro* aux conditions simulant le tractus gastro-intestinal

3.1. Test de survie à l'acidité

L'évaluation de la résistance des souches sélectionnées à l'acidité est réalisée selon une modification du protocole de Thirabunyanon *et al.* (2009).

Le principe de ce test est basé sur l'exposition des souches à des milieux de faibles pH pendant un certain temps, suite à quoi, leur survie est déterminée par dénombrement des colonies sur milieu gélosé en comparaison avec un témoin.

Afin de simuler les conditions acides de l'estomac, une gamme de solutions de pH 2, pH 3, pH 4 et pH 7 (comme témoin) est réalisée. La solution de base employée est de nature isotonique, il s'agit de la solution saline équilibrée de Hank's *Balanced Salt Solution* (HBSS, Fisher Scientific). Celle-ci est ajustée avec du HCl (1 M) au pH requis à l'aide d'un pH-mètre. Toute la gamme de solutions est ensuite stérilisée par filtration (0,45 µm, Sartorius).

Des pré-cultures à 1% (v/v) sont effectuées dans du lait écrémé additionné de 1% (p/v) de bacto tryptone (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, États-Unis) et incubées pendant 18 heures à 42°C. Les souches de référence *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG : LGG (ATCC® 53103™) sont pré-cultivées dans les bouillons LM17 à 42°C et MRS (Sigma Aldrich) à 37°C, respectivement.

Les cultures sont réalisées par ensemencement à 1% (v/v) de la pré-culture dans le bouillon LM17 et incubées à 42°C pour le genre *Streptococcus* et dans le bouillon MRS à 37°C pour *Lb. rhamnosus*. Après 14 heures d'incubation, les cultures sont centrifugées à 1 878 g pendant 15 minutes à 37°C puis les culots bactériens sont lavés une fois avec la solution HBSS. Ensuite, les cellules bactériennes sont remises en suspension dans un volume de HBSS permettant d'atteindre une concentration finale d'environ 10¹⁰ UFC/mL. Celle-ci correspond à des densités optiques (DO)_{600 nm} d'environ 15 pour *S. thermophilus*, 20 pour *S. macedonicus* et une DO_{650 nm} de 90 pour *Lb. rhamnosus* GG (les volumes de cultures initiales prévues sont respectivement, de 50, 100 et 200 mL).

Un volume de 0,2 mL de la suspension bactérienne est ajouté à 1,8 mL de chaque solution HBSS ajustée aux pH 2, pH 3, pH 4 et pH 7 (témoin). Les bactéries exposées à ces milieux sont ensuite incubées à 37°C pendant 2 heures.

Des prélèvements sont réalisés juste avant incubation au temps 0 (0 h) et après 2 heures d'expositions des bactéries aux différents milieux acides. Des dilutions en cascades sont réalisées puis un étalement de 0,1 mL de chaque dilution est effectué sur les géloses LM17 pour les streptocoques et MRS pour la souche *Lb. rhamnosus* GG. Après incubation des bactéries à 42°C (37°C pour la souche *Lb. rhamnosus* GG) en anaérobiose pendant 24 à 48 heures, leur survie est estimée par dénombrement des bactéries viables et les résultats sont exprimés en Log₁₀ UFC/mL.

3.2. Test de survie aux sels biliaires

La capacité de survie des souches en présence de différentes concentrations en SB a été déterminée selon le protocole de Kebouchi *et al.* (2016).

La solution de SB utilisée a été préparée dans du HBSS avec un mélange équimolaire de SB (MSB) à une concentration de 100 mM. Ce mélange contient le taurocholate de sodium, le cholate de sodium et le désoxycholate de sodium (Sigma-Aldrich).

Avant l'utilisation de la solution du MSB, celle-ci est stérilisée à 95°C pendant 15 minutes, ensuite, des concentrations intermédiaires sont effectuées dans du HBSS.

Les pré-cultures et les cultures des souches bactériennes sélectionnées et de référence (*S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rahmnosus* GG) sont réalisées dans les mêmes conditions décrites dans la section précédente (section 3.1).

Après 14 heures de culture dans le bouillon LM17 à 42°C pour les streptocoques (MRS à 37°C pour *Lb. rahmnosus* GG), les suspensions bactériennes sont centrifugées pendant 15 minutes à 1 878 g et à 37°C. Les culots sont lavés une fois avec du HBSS et remis en suspension dans les bouillons LM17 pour les streptocoques et MRS pour la souche *Lb. rahmnosus* GG à une concentration finale de 10¹⁰ UFC/mL.

Les suspensions bactériennes (1,8 mL) sont additionnées, chacune d'un volume de 0,2 mL de MSB. Les bactéries sont alors exposées au MSB aux concentrations finales de 4, 5, 6 et 10 mM (témoin négatif 0 mM). Ces concentrations sont obtenues telles que c'est décrit au tableau 08. Des volumes de MSB à 100 mM sont alors dilués dans des solutions HBSS pour obtenir les concentrations intermédiaires de 40, 50 et 60 mM. A partir de ces solutions, un volume de 0,2 mL est ajouté à 1,8 mL de suspension bactérienne afin d'atteindre les concentrations finales du MSB.

Tableau 08. Préparation des solutions de sels biliaires

V. MSB (100 mM) (μ L)	V. HBSS (μ L)	CI. MSB (mM)	V. MSB (CI) (μ L)	CB (μ L)	CF. MSB (mM)
0	2000	0	200	1800	0
800	1200	40	200	1800	4
1000	1000	50	200	1800	5
1000	660	60	200	1800	6
2000	0	100	200	1800	10

V : volume ; MSB 100 mM : mélange de SB à la concentration de 100 mM ; CI : concentration intermédiaire ; CF : concentration finale ; CB : culture bactérienne.

Toutes les suspensions bactériennes exposées ou non aux différentes concentrations de MSB sont incubées pendant 2 heures à 37°C. Un volume de 100 μ L est prélevé de chaque suspension bactérienne exposée ou non aux différentes concentrations en MSB avant et après incubation (0 h et 2 h). Des dilutions en série sont réalisées et étalées à raison de 0,1 mL sur la gélose LM17 pour les streptocoques et sur la gélose MRS pour la souche *Lb. rahmnosus* GG. Après incubation des streptocoques à 42°C et de la souche de lactobacille à 37°C pendant 24 à 48 heures en

conditions d'anaérobiose, la survie des bactéries est évaluée par un dénombrement des bactéries viables et les résultats sont exprimés en Log_{10} UFC/mL de cellules bactériennes viables.

4. Adhésion *in vitro* des souches aux cellules épithéliales intestinales

Trois modèles cellulaires différents ont été utilisés pour l'étude de l'adhésion *in vitro* de nos souches aux cellules épithéliales intestinales. Il s'agit des lignées de cellules Caco-2 TC7 obtenues grâce au Pr. Isabelle Chevalot (UMR 7274, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, Nancy, France), les cellules sécrétrices de mucus HT29-MTX ayant été fournies par Thécla Lesuffleur (INSERM UMR S 938, Paris, France) (Lesuffleur *et al.*, 1990) ainsi que les cellules HT29-CL.16E, obtenues auprès d'Ephyscience (Nantes, France) (Augeron et Laboisie 1984).

Les trois lignées sont issues d'adénocarcinome colique humain. Les cellules Caco-2 TC7 ayant la particularité de ne pas sécréter de mucus (Pinto *et al.*, 1983 ; Liévin-Le Moal et Servin, 2013), tandis que les deux autres lignées produisent du mucus essentiellement gastrique (MUC5AC) pour les cellules HT29-MTX (Augeron et Laboisie, 1984 ; Velcich *et al.*, 1995) et intestinal (MUC2) pour les cellules HT29-CL.16E (Lesuffleur *et al.*, 1990).

Avant de procéder aux tests d'adhésion, les trois lignées cellulaires ont été mises en culture au laboratoire URAFPA (INRA, Université de Lorraine) selon le protocole du laboratoire.

4.1. Culture cellulaire

Les cellules eucaryotes étant extrêmement sensibles aux contaminations, leur culture est réalisée dans un environnement stérile tenant compte des exigences de désinfection et de stérilisation. La culture des cellules s'est déroulée dans une pièce isolée avec une hotte à flux laminaire vertical.

Les lignées cellulaires Caco-2 TC7 sont cultivées dans le milieu *Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium* (DMEM, Glutamax, Gibco, Fisher Scientific) supplémenté de 4,5 g/L de glucose, contenant 20% (v/v) de Sérum de Veau Fœtal décomplémenté (SVF ; Gibco), 1% (v/v) d'acides aminés non essentiels et 1% (v/v) d'antibiotiques (Gibco) : pénicilline (5 000 U/mL) et streptomycine (5 000 µg/mL).

Quant aux cellules HT-29, le milieu DMEM à 4,5 g/L de glucose est supplémenté de 10% (v/v) de sérum de SVF (Gibco), et 1% (v/v) d'antibiotiques : pénicilline (5 000 U/mL) et streptomycine (5 000 µg/mL).

Après décongélation, les cellules sont d'abord cultivées dans des flacons en plastique à bouchons ventilés de 25 cm² ou 75 cm² (Dutscher) dans du DMEM à 37°C en atmosphère humide (90%) enrichie à 10% de CO₂.

Au bout de 4 jours de culture, les cellules arrivent à confluence (formation de tapis cellulaire), elles peuvent alors être repiquées. Il faut noter que le milieu de culture est changé 48 heures après repiquage puis tous les jours afin d'assurer un apport régulier des nutriments essentiels nécessaires à la croissance et à la multiplication des cellules.

Le milieu de culture est alors aspiré, le tapis cellulaire est rincé avec une solution tamponnée saline de phosphate PBS (*Phosphate Buffered saline*, Gibco) sans calcium ni magnésium, préalablement chauffé à 37°C, puis 5 mL de trypsine à 0,05% (Gibco) sont ajoutés. Les cellules et la trypsine sont incubées à 37°C pendant 5 à 10 minutes pour décoller toutes les cellules. La trypsine est ensuite neutralisée avec le même volume du milieu de culture DMEM, puis l'ensemble est centrifugé à 470 g pendant 5 minutes à 37°C.

Les culots sont repris dans 5 mL du milieu DMEM, approprié pour chaque type cellulaire par pipetages répétés et les cellules sont comptées sur une cellule de Malassez. L'ensemencement est effectué à un taux de 100 000 cellules/25 cm² et 500 000 cellules/75 cm² et les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide (90%) enrichie à 10% de CO₂.

Une fois arrivée à confluence, après observation du tapis cellulaire au microscope inversé (Nikon), les cellules sont alors ensemencées en puits. Elles sont trypsinées dans les mêmes conditions que décrites ci-dessus. L'ensemencement est effectué à partir des suspensions cellulaires dans des boîtes de culture stériles (Dutscher) à 6 puits (avec une surface effective de 9,7 cm²) à des taux d'environ 6.10^4 ; $2,4.10^4$ et 4.10^4 cellules/cm² pour les cellules Caco-2 TC7, HT29-MTX et HT29-CL.16E, respectivement. Toutes les cellules sont maintenues dans le milieu de culture DMEM, adapté à chaque type cellulaire, supplémenté d'antibiotiques à 37°C, en atmosphère humide contenant 10% de CO₂ pendant 21 à 25 jours, au bout desquels la différenciation des monocouches est obtenue.

Il est à indiquer que les antibiotiques sont ôtés du milieu de culture (DMEM) deux jours avant le test d'adhésion afin d'éviter les interactions avec les bactéries.

4.2. Tests d'adhésion

L'adhésion *in vitro* des souches de streptocoques sélectionnées aux trois lignées de cellules épithéliales a été évaluée selon le protocole de Kebouchi *et al.* (2016). Les souches

S. thermophilus LMD-9 et *Lb. rahnmosus* GG ont également été utilisées comme souches de référence pour ces tests.

Le principe de la technique repose sur la mise en contact des bactéries à tester avec les cellules intestinales (cultivées au préalable *in vitro* pendant 21 à 25 jours) pendant 2 heures à 37°C, température physiologique du corps humain (figure 09). Après élimination du surnageant et lavage, le nombre de bactéries qui ont adhéré est déterminé par dénombrement sur milieu gélosé. Les cultures et les pré-cultures des différentes souches à tester (souches sélectionnées et de référence) ont été réalisées dans les conditions décrites dans la section 4.1.

Les cellules bactériennes issues des cultures de 14 heures sont centrifugées pendant 15 minutes à 1 878 g et à 37°C. Les culots sont lavés avec la solution HBSS et remis en suspension dans le milieu DMEM dépourvu d'antibiotiques à une concentration de 10¹⁰ UFC/mL. Une aliquote de cette suspension est prélevée pour déterminer le nombre de bactéries initiales après dilution, étalement sur milieux gélosés LM17 et MRS et incubation aux températures de 42°C et 37°C pour les streptocoques et la souche *Lb. rahnmosus* GG, respectivement pendant 24 heures.

Avant de procéder au test d'adhésion proprement dit, le milieu DMEM est ôté des puits, et les cellules épithéliales sont délicatement lavées avec 1 mL de solution HBSS préalablement chauffée à 37°C pour éliminer les cellules mortes et les débris cellulaires. Dans chaque puits contenant une monocouche de cellules épithéliales, un volume de 2 mL de la suspension bactérienne est déposée à une concentration finale de 10¹⁰ UFC/mL (DO_{600 nm}, d'environ 15 et 20, respectivement, pour *S. thermophilus* et *S. macedonicus* et DO_{650 nm} d'environ 90 pour *Lb. rahnmosus* GG). Cela permet d'avoir un ratio de cellules bactériennes/cellules épithéliales de 1 000 pour 1. L'ensemble est ensuite incubé pendant 2 heures à 37°C, en atmosphère humide (90%) contenant 10% de CO₂.

Après incubation, 2 mL des surnageants de chaque puits sont récupérés et les monocouches cellulaires sont lavées quatre fois en déposant délicatement 1 mL de solution HBSS le long de la paroi du puits à chaque fois. Ces 4 mL de lavage sont rajoutés aux surnageants puis récupérés après incubation contenant ainsi les bactéries qui n'ont pas adhéré aux cellules épithéliales, elles seront par conséquent dénombrées.

Les monocouches de cellules (culots) sont alors raclées trois fois avec 1 mL (3*1 mL) de Triton X-100 (Sigma) à 0,1% (v/v) à l'aide d'un grattoir (Dominique Dutscher) et récupérées dans un tube stérile. Cette solution (cellules et triton) est ensuite passée trois fois à travers une seringue > 21 G (Gauge) puis incubée pendant 30 minutes à température ambiante. Ces culots

représentent les bactéries ayant adhéré aux cellules épithéliales et sont alors dénombrées après dilution et étalement sur gélose appropriée (LM17 ou MRS) pour chaque genre bactérien utilisé dans cette étude et incubation aux températures adéquates (42°C ou 37°C) en conditions d'anaérobiose pendant 24 à 48 heures.

Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries adhérentes exprimé en UFC/mL par cellule épithéliale (le nombre de cellules épithéliales contenues dans un puits étant de $11 \cdot 10^6$).

Il est à souligner que des tests préliminaires d'adhésion ont été menés avec les souches *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rahmnosus* GG en puits en inserts afin de choisir le support d'adhésion à adopter. Ces tests ont été réalisés dans les mêmes conditions de culture cellulaire et d'adhésion décrits ci-dessus.

5. Analyse statistique des résultats

Les données des expérimentations sur la survie à l'acidité et aux sels biliaires ainsi que celles relatives à l'adhésion bactérienne sont issues de deux expériences réalisées en duplicatas indépendants. Elles ont été traitées à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) suivie d'une comparaison de plusieurs moyennes avec la correction de Tukey. Les résultats ont été exprimés en moyenne avec l'erreur type (SEM : *Standard Error of the Mean*). Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque la valeur de $p < 0,05$.

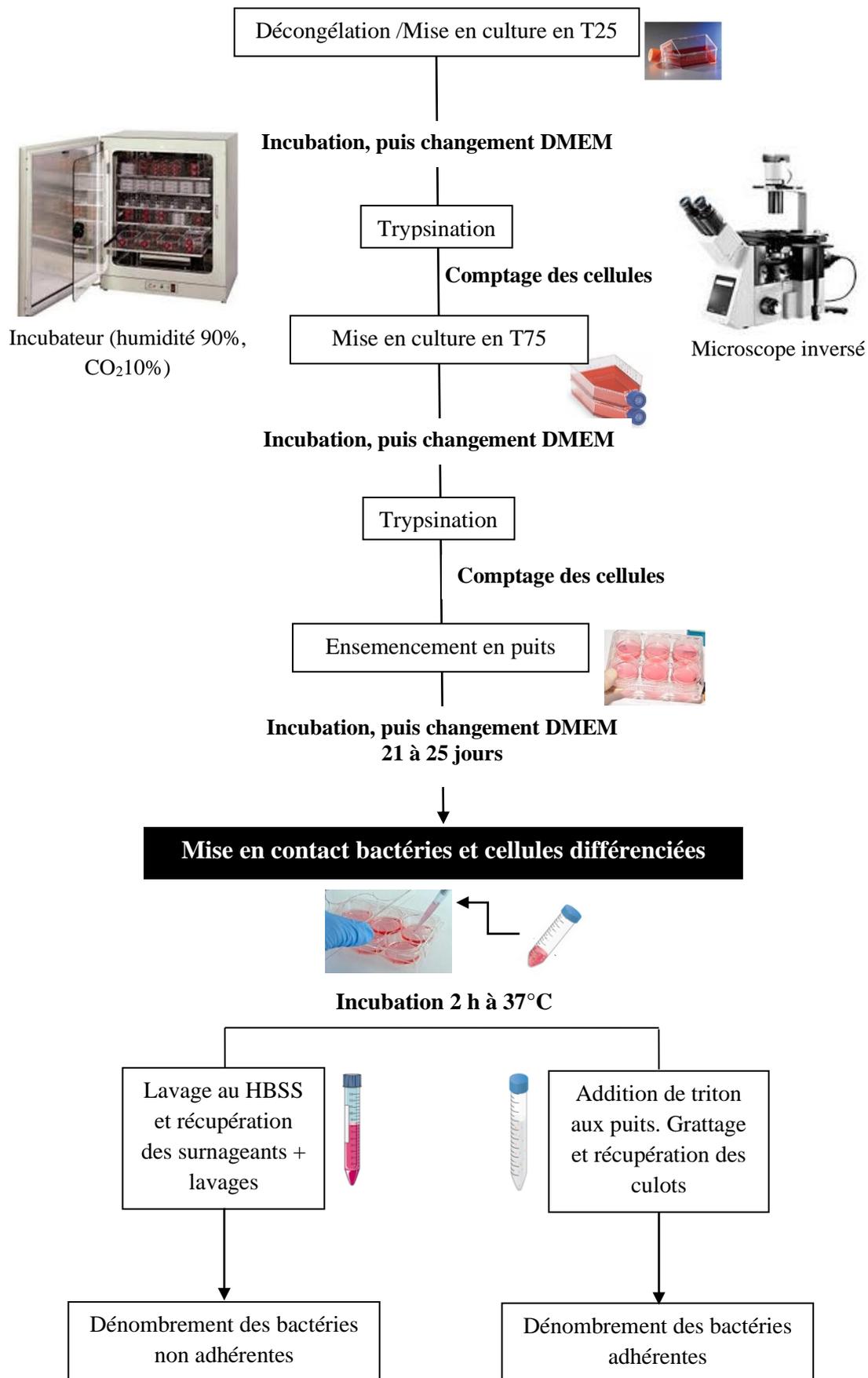


Figure 09. Principe général de l'adhésion *in vitro* des bactéries aux cellules épithéliales intestinales

Résultats
et
Discussions

1. Isolement et identification des isolats

Le premier objectif de ce travail était d'isoler de nouvelles souches de *S. thermophilus* et de *S. macedonicus*, dans des laits fermentés traditionnels collectés au niveau de la région de Constantine (Algérie). Notons qu'il s'agit des seules espèces inoffensives d'origine alimentaire du genre *Streptococcus*. A ce jour, *S. thermophilus* est largement utilisée en industrie alimentaire. *S. macedonicus* pourrait l'être également dans un avenir proche.

D'autre part, ces deux espèces sont souvent les plus représentées du genre dans le lait de vache et les produits laitiers (Yin, 2014). *S. thermophilus* est d'ailleurs souvent isolée dans des laits fermentés et des fromages de par le monde (Andrighetto *et al.*, 2002 ; Mora *et al.*, 2002 ; Gezginc *et al.*, 2015). Quant à *S. macedonicus*, elle a été mise en évidence surtout dans des fromages traditionnels grecques, mais aussi italiens, français, *etc.* (Tsakalidou *et al.*, 1998 ; Callon *et al.*, 2004 ; Lombardi, 2004 ; De Vuyst et Tsakalidou, 2008).

Ces éléments nous ont incités à rechercher ces deux espèces dans des produits laitiers fermentés traditionnels algériens. Notre choix s'est porté sur les *lben* et *rayeb* considérés comme les seuls laits fermentés traditionnels connus, consommés, et fabriqués jusqu'à présent dans cette région d'Algérie. Ils sont, habituellement, soit produits au niveau des fermes pour une consommation familiale, soit fabriqués chez les laitiers à partir de laits crus issus de plusieurs fermes, ce qui suggère une diversité de la matière première et par la même de la flore lactique.

Afin d'atteindre notre objectif, nous avons combiné des approches phénotypiques et génotypiques pour identifier les isolats issus des quarante produits fermentés dont 17 *lben* et 23 *rayeb* recueillis dans 12 fermes et auprès de 13 laitiers.

1.1. Identification phénotypique des isolats

L'isolement des souches a été réalisé sur gélose M17 supplémentée de lactose (LM17) à 42°C favorisant la sélection de coques thermophiles. L'aspect morphologique, à l'échelle macro et microscopique, des colonies et des cellules obtenues sur gélose LM17 selon les conditions sus-citées ainsi que la recherche de la catalase ont permis d'isoler 670 coques lactiques thermophiles. Ceux-ci se présentaient, après purification par repiquages successifs sur gélose LM17, sous l'aspect de colonies circulaires, de petite à moyenne taille (≤ 1 mm de diamètre), et de couleur blanchâtre. Quant à l'aspect microscopique, ces isolats apparaissaient en forme de coques, disposés en chaîne plus ou moins longue, à coloration Gram positif (figures 10 et 11). Tous étaient dépourvus de catalase (tableau 09).

Tableau 09. Isolement de coques lactiques thermophiles

No.	Code du produit	Lait fermenté	Provenance	Nombre d'isolats
1	LB1	<i>Lben</i>	Laitier 1	10
2	Rb1	<i>Rayeb</i>	Laitier 2	11
3	LbFb2	<i>Lben</i>	Laitier 3	17
4	RbFb1	<i>Rayeb</i>	Laitier 3	18
5	LbFb1	<i>Lben</i>	Laitier 4	18
6	RbFb2	<i>Rayeb</i>	Laitier 4	16
7	LbG1	<i>Lben</i>	Laitier 5	18
8	RbG1	<i>Rayeb</i>	Laitier 5	17
9	LbG2	<i>Lben</i>	Laitier 6	19
10	RbG2	<i>Rayeb</i>	Laitier 6	16
11	LbK1	<i>Lben</i>	Laitier 7	18
12	Rbk1	<i>Rayeb</i>	Laitier 7	17
13	Lbk2	<i>Lben</i>	Laitier 8	16
14	Rbk2	<i>Rayeb</i>	Laitier 8	17
15	Lbk3	<i>Lben</i>	Laitier 9	18
16	Rbk3	<i>Rayeb</i>	Laitier 9	16
17	Lbk4	<i>Lben</i>	Laitier 10	17
18	Rbk4	<i>Rayeb</i>	Laitier 10	18
19	LbS	<i>Lben</i>	Laitier 11	19
20	RbS	<i>Rayeb</i>	Laitier 11	16
21	LbA	<i>Lben</i>	Laitier 12	13
22	RbA	<i>Rayeb</i>	Laitier 12	16
23	LbW	<i>Lben</i>	Laitier 13	17
24	LbN1	<i>Lben</i>	Ferme 1	16
25	RbN1	<i>Rayeb</i>	Ferme 1	18
26	LbN2	<i>Lben</i>	Ferme 2	15
27	RbN2	<i>Rayeb</i>	Ferme 2	17
28	LbN3	<i>Lben</i>	Ferme 3	15
29	RbN3	<i>Rayeb</i>	Ferme 3	18
30	LbN4	<i>Lben</i>	Ferme 4	16
31	RbN4	<i>Rayeb</i>	Ferme 4	19
32	Lbchek	<i>Lben</i>	Ferme 5	17
33	RbMR1	<i>Rayeb</i>	Ferme 6	18
34	RbMR2	<i>Rayeb</i>	Ferme 7	18
35	RbFz	<i>Rayeb</i>	Ferme 8	19
36	Rb1FP	<i>Rayeb</i>	Ferme 9	18
37	Rb2FP	<i>Rayeb</i>	Ferme 9	17
38	RbJ	<i>Rayeb</i>	Ferme 10	18
39	RbM	<i>Rayeb</i>	Ferme 11	16
40	RbC	<i>Rayeb</i>	Ferme 12	17
Total	40	<i>Rayeb</i> (23), <i>Lben</i> (17)	Fermes (12), Laitiers (13)	670

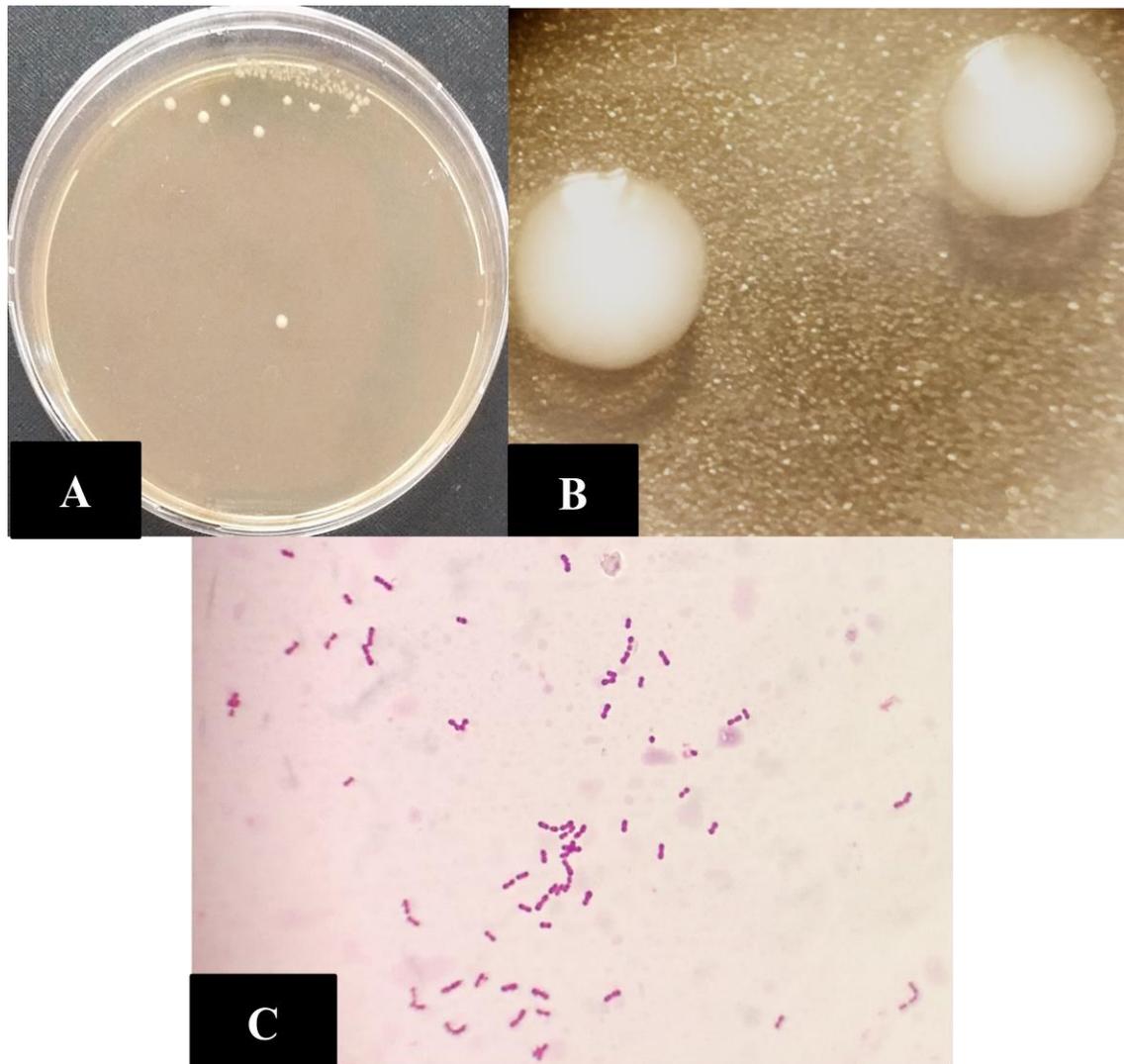


Figure 10. Aspects macroscopique et microscopique de l'isolat PA

A : aspect des colonies sur gélose LM17 dans boîte de pétri, B : morphologie des colonies visualisées par la loupe binoculaire, C : forme des cellules après coloration de Gram visualisées par microscope optique (Motic modèle 18-28)

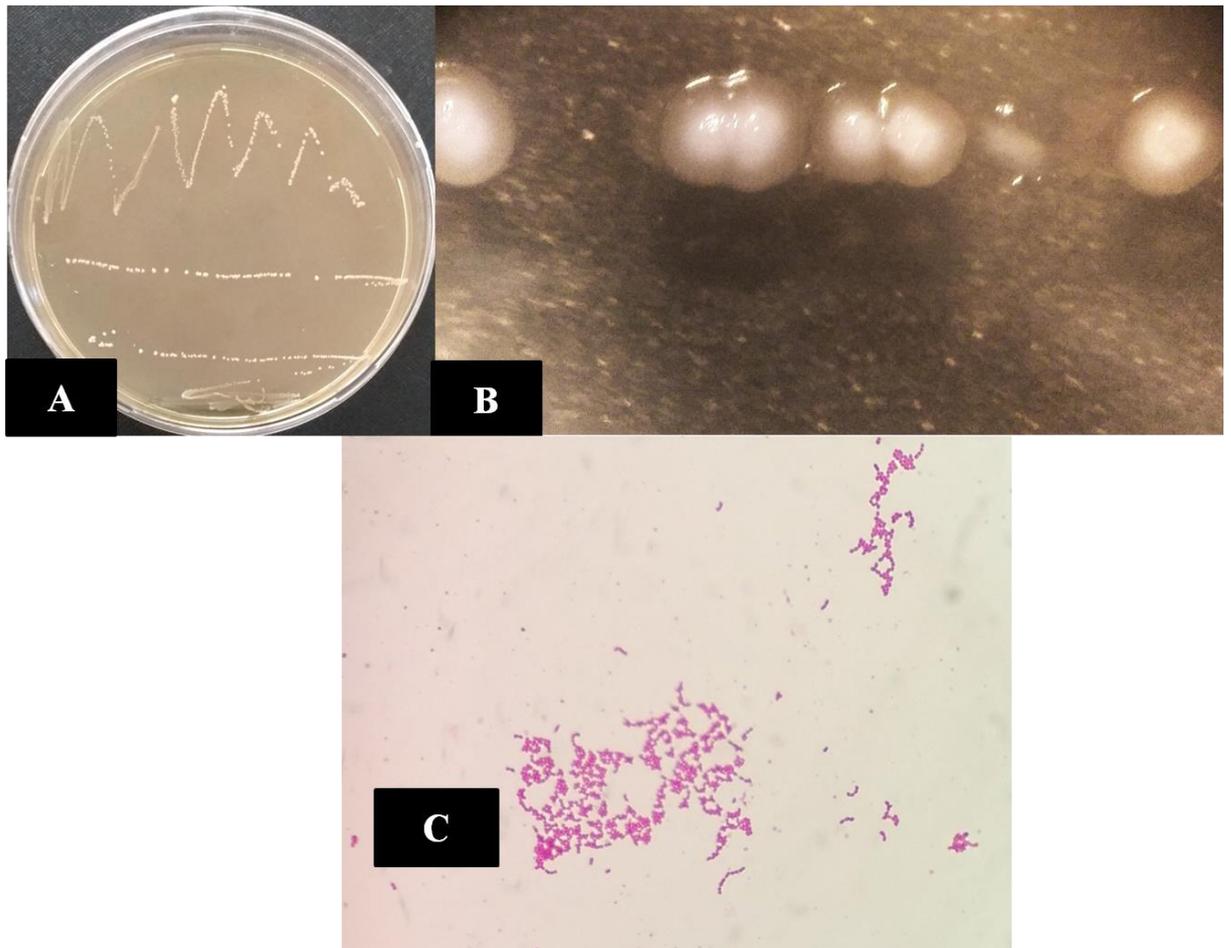


Figure 11. Aspects macroscopique et microscopique de l'isolat LF9

A : aspect des colonies sur gélose LM17 dans boîte de pétri, B : morphologie des colonies visualisées par la loupe binoculaire, C : forme des cellules après coloration de Gram visualisées par microscope optique (Motic modèle 18-28)

Par la suite, et dans le but d'affiner davantage la sélection au niveau du genre, une caractérisation physiologique a été menée sur les 670 isolats. Ils ont été testés sur leur capacité, d'abord, à dégrader l'esculine afin essentiellement d'exclure de la sélection les entérocoques. En outre, leur incapacité à croître dans des milieux hostiles à 6,5% de NaCl (p/v) et à pH 9,6 permet de pousser la sélection au niveau de l'espèce en se rapprochant des caractéristiques générales des espèces *S. thermophilus* et *S. macedonicus*.

A l'issue de ces tests, 20 isolats ont été pré-identifiés comme appartenant aux espèces recherchées et ont, par conséquent, été retenus dans la sélection. Il a été constaté que 22 autres isolats étaient incapables de croître à 6,5% (p/v) de NaCl mais pouvaient se développer à pH 9,6 et dégrader l'esculine. Ils ont également été retenus pour une identification moléculaire (tableau 10).

Tous les isolats se sont vus attribuer un code composé en général de lettres en référence au type et au lieu de collecte du produit et un numéro identifiant l'isolat.

Tableau 10. Caractérisation physiologique des coques lactiques thermophiles

No	Isolat	Origine	BEA	pH 9,6	NaCl 6,5%
1	LK13	<i>Lben</i> (LbK1)	-	-	-
2	LS1	<i>Lben</i> (LbS)	-	-	-
3	LS2	<i>Lben</i> (LbS)	-	-	-
4	LS4	<i>Lben</i> (LbS)	-	-	-
5	LS5	<i>Lben</i> (LbS)	-	-	-
6	LS6	<i>Lben</i> (LbS)	-	-	-
7	LS7	<i>Lben</i> (LbS)	-	-	-
8	PA	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	-	-	-
9	PB	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	-	-	-
10	PT	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	-	-	-
11	P1	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	-	-	-
12	P12	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	-	-	-
13	P13	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	-	-	-
14	P14	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	-	-	-
15	P16	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	-	-	-
16	P18	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	-	-	-
17	P19	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	-	-	-
18	P2	<i>Rayeb</i> (Rb2FP)	-	-	-

Tableau 10. Caractérisation physiologique des coques lactiques thermophiles (suite)

No.	Isolat	Origine	BEA	pH 9,6	NaCl 6,5%
19	LF9	<i>Lben</i> (LbFb2)	-	-	-
20	LA14	<i>Lben</i> (LbA)	-	-	-
21	RS6	<i>Rayeb</i> (RbS)	+	+	-
22	RS2	<i>Rayeb</i> (RbS)	+	+	-
23	RS3	<i>Rayeb</i> (RbS)	+	+	-
24	RS4	<i>Rayeb</i> (RbS)	+	+	-
25	RFA5	<i>Rayeb</i> (RbFb1)	+	+	-
26	RFA6	<i>Rayeb</i> (RbFb1)	+	+	-
27	RM5	<i>Rayeb</i> (RbM)	+	+	-
28	RM6	<i>Rayeb</i> (RbM)	+	+	-
29	RM9	<i>Rayeb</i> (RbM)	+	+	-
30	RGA8	<i>Rayeb</i> (RbG1)	+	+	-
31	RGB2	<i>Rayeb</i> (RbG2)	+	+	-
32	RGB5	<i>Rayeb</i> (RbG2)	+	+	-
33	RGB6	<i>Rayeb</i> (RbG2)	+	+	-
34	LGA4	<i>Lben</i> (LbG1)	+	+	-
35	LKD4	<i>Lben</i> (LbK4)	+	+	-
36	LNA6	<i>Lben</i> (LbN1)	+	+	-
37	LNA13	<i>Lben</i> (LbN1)	+	+	-
38	RNC2	<i>Rayeb</i> (RbN3)	+	+	-
39	RNC9	<i>Rayeb</i> (RbN3)	+	+	-
40	RJ2	<i>Rayeb</i> (RbJ)	+	+	-
41	RC9	<i>Rayeb</i> (RbC)	+	+	-
42	RC13	<i>Rayeb</i> (RbJ)	+	+	-

(-) résultat négatif, (+) résultat positif

Ces résultats permettent d'abord, de souligner la sélectivité du milieu LM17 vis-à-vis des coques. Il est à noter qu'au cours de cette sélection, très peu d'isolats en forme de bâtonnets ont été observés. De plus, les conditions de culture (milieu de culture et température) adoptées dans le protocole d'isolement empêchent le développement des coques lactiques mésophiles représentés par les

genres *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactococcus* habituellement présents dans les laits fermentés traditionnels.

En outre, la présence de 670 coques lactiques thermophiles dans 40 *lben* et *rayeb* indique que la flore lactique thermophile n'est pas négligeable pour des produits réputés être dominés par une flore mésophile. D'après Bennama (2012), la flore lactique thermophile est nettement inférieure dans le lait cru ($1,2 \times 10^3$ UFC/mL) par rapport au *lben* qui s'élève à $1,0 \cdot 10^6$ UFC/mL ou encore dans le beurre traditionnel ($1,2 \times 10^7$ UFC/mL). Il est probable que les conditions de fermentation aient favorisé le développement de cette flore dans nos produits tel que cela a été rapporté par Fugl *et al.* (2014). Les auteurs avaient signalé la prédominance de flore lactique thermophile dans des laits de chamelle fermentés spontanément à une température de 42°C plutôt qu'à 30°C.

Toutefois, cette flore thermophile détectée dans nos échantillons est largement dominée, selon les résultats de l'identification phénotypique, par les entérocoques. Ce résultat concorde avec celui obtenu par Ghalouni *et al.* (2018), où les entérocoques étaient identifiés à hauteur de 80% dans le *lben* algérien. Ce genre est fréquemment rencontré dans le lait et les produits laitiers traditionnels algériens tels que beurre et fromage *bouhezza* (Bensalah *et al.*, 2011 ; Aissaoui Zitoun *et al.*, 2012 ; Bendimerad, *et al.*, 2012), *lben* marocain (Ouadghiri *et al.*, 2009), laits fermentés traditionnels ghanéens, burkinabés et africains d'une manière générale (Akabanda *et al.*, 2010 ; Jans *et al.*, 2017 ; Bayili *et al.*, 2019) et également dans des fromages traditionnels italiens (Dal Bello *et al.*, 2010 ; Gaglio *et al.*, 2019).

La forte prévalence des entérocoques dans les produits laitiers est considérée comme un indicateur de conditions d'hygiène insuffisante d'élevage et de traite. En même temps, il n'en demeure pas moins que certaines espèces soient responsables de la flaveur recherchée dans certains fromages et yaourts, ainsi que de la production de bactériocines (Giraffa *et al.*, 1997 ; Jans *et al.*, 2017 ; Tabrejee *et al.*, 2018).

Par ailleurs, il semble que les espèces *S. thermophilus* et *S. macedonicus* partagent les mêmes caractéristiques morphologiques et physiologiques ciblées dans le protocole d'identification, et il n'a donc pas été possible de les distinguer parmi les 20 isolats retenus au niveau phénotypique. En effet, souvent l'identification phénotypique se révèle insuffisante notamment pour des espèces ayant des caractéristiques phénotypiques proches ou pour certaines souches pouvant exprimer des traits inhabituels à l'espèce. A ce titre, une large hétérogénéité phénotypique au sein des souches de *S. thermophilus* isolées de différents produits laitiers a été observée dans les travaux de Giraffa *et al.* (2001). La plupart des souches ont été qualifiées d'atypiques en raison de leur capacité à

fermenter le galactose. Il est à noter que cette caractéristique était considérée comme la plus discriminante pour l'identification de *S. thermophilus* selon la taxonomie traditionnelle. De même, Bensalah *et al.* (2009) ont identifié phénotypiquement une souche atypique de *L. lactis* comme étant une souche de *S. thermophilus* mais la méthode moléculaire a permis de dissiper la confusion.

Dans le même contexte, les 22 isolats caractérisés par une croissance négative à 6,5% de NaCl et positive à pH 9,6 ont été retenus pour l'identification moléculaire tant les critères phénotypiques ne sont pas toujours suffisamment discriminants dans le cas de souches atypiques. Pour exemple, des souches de *L. lactis* étaient capables de croître à 6,5% (p/v) de NaCl et pH 9,6, ce qui n'est pas habituel pour cette espèce (Fortina *et al.*, 2003 ; Bensalah *et al.*, 2009). De plus, en ce qui concerne *S. macedonicus*, l'espèce est en émergence, peu de souches sont connues laissant alors le champ ouvert à de nouvelles souches phénotypiquement différentes de celles étudiées à ce jour.

Néanmoins, malgré les limites des méthodes phénotypiques, celles-ci sont nécessaires et présentent l'avantage de permettre une pré-identification des isolats les plus pertinents dans le cadre d'une démarche de sélection. Cela réduit considérablement le coût de l'identification génotypique notamment en passant de 670 à une quarantaine d'isolats à identifier au niveau moléculaire.

1.2. Identification génotypique des isolats

L'identification génotypique des isolats pré-sélectionnés a été effectuée par l'analyse du gène codant l'ARNr 16S. Les résultats obtenus ont été confirmés par l'analyse de l'espace intergénique ITS 16S-23S qui permet également de mettre en évidence une éventuelle divergence entre les souches. Celle-ci a été investiguée par l'analyse du gène *sodA* codant la superoxyde dismutase ainsi que les méthodes *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) et *Multi-locus Sequence Typing* (MLST).

1.2.1. Analyse du gène codant l'ARNr 16S

L'amplification et le séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S des isolats pré-sélectionnés par méthode phénotypique présentés dans le tableau 09 a permis de confirmer l'appartenance des 20 isolats aux espèces présumées *S. thermophilus* et *S. macedonicus*. Parmi lesquels, 18 présentent 100% de similarité avec la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198. L'isolat *S. thermophilus* LF9 montre une similarité de 100% avec les souches *S. thermophilus* MN-ZLW-002, CNRZ1066 alors que l'isolat *S. thermophilus* LA14 présente une similarité de 99,62% avec les souches *S. thermophilus* LMD-9 et *S. thermophilus* JIM 8232 (Genbank : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tableau 11. Typage moléculaire (ARNr 16S, ITS 16S-23S, *sodA*) des isolats sélectionnés

No	Isolat	Origine	ARNr 16S	ITS 16S-23S	<i>SodA</i>
1	LK13	<i>Lben</i> (LbK1)	<i>S. macedonicus</i>	100%% d'identité avec la souche	
2	LS1	<i>Lben</i> (LbS)	<i>S. macedonicus</i>	<i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198	
3	LS2	<i>Lben</i> (LbS)	<i>S. macedonicus</i>		
4	LS4	<i>Lben</i> (LbS)	<i>S. macedonicus</i>		
5	LS5	<i>Lben</i> (LbS)	<i>S. macedonicus</i>		
6	LS6	<i>Lben</i> (LbS)	<i>S. macedonicus</i>		
7	LS7	<i>Lben</i> (LbS)	<i>S. macedonicus</i>		
8	PA	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	<i>S. macedonicus</i>	100%% d'identité avec la souche	
9	PB	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	<i>S. macedonicus</i>	<i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198	
10	PT	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	<i>S. macedonicus</i>		
11	P1	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	<i>S. macedonicus</i>		
12	P12	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	<i>S. macedonicus</i>		
13	P13	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	<i>S. macedonicus</i>		
14	P14	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	<i>S. macedonicus</i>		
15	P16	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	<i>S. macedonicus</i>		
16	P18	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	<i>S. macedonicus</i>		
17	P19	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	<i>S. macedonicus</i>		
18	P2	<i>Rayeb</i> (Rb2FP)	<i>S. macedonicus</i>		
ITS I					
19	LF9	<i>Lben</i> (LbFb2)	<i>S. thermophilus</i>	100%% d'identité avec <i>S. thermophilus</i> MN-ZLW- 00 et CNRZ1066	-
ITS II					
20	LA14	<i>Lben</i> (LbA)	<i>S. thermophilus</i>	100%% d'identité avec <i>S. thermophilus</i> LMD-9 et JIM 8232	-
21	RS6	<i>Rayeb</i> (RbS)	<i>E. faecalis</i>	-	-
22	RS2	<i>Rayeb</i> (RbS)	<i>E. faecalis</i>	-	-
23	RS3	<i>Rayeb</i> (RbS)	<i>E. faecalis</i>	-	-
24	RS4	<i>Rayeb</i> (RbS)	<i>E. faecalis</i>	-	-
25	RFb5	<i>Rayeb</i> (RbFb1)	<i>S. lutetiensis</i>	-	-
26	RFb6	<i>Rayeb</i> (RbFb1)	<i>S. lutetiensis</i>	-	-

Tableau 11. Typage moléculaire (ARNr 16S, ITS 16S-23S, *sodA*) des isolats sélectionnés (suite)

No	Isolat	Origine	ARNr 16S	ITS	SodA
27	RM5	Rayeb (RbM)	<i>E. faecalis</i>	-	-
28	RM6	Rayeb (RbM)	<i>E. faecalis</i>	-	-
29	RM9	Rayeb (RbM)	<i>E. faecalis</i>	-	-
30	RGA8	Rayeb (RbG1)	<i>S. equinus</i>	-	-
31	RGB2	Rayeb (RbG2)	<i>S. lutetiensis</i>	-	-
32	RGB5	Rayeb (RbG2)	<i>S. lutetiensis</i>	-	-
33	RGB6	Rayeb (RbG2)	<i>S. lutetiensis</i>	-	-
34	LGA4	Lben (LbG1)	<i>E. faecalis</i>	-	-
35	LKD4	Lben (LbK4)	<i>E. faecalis</i>	-	-
36	LNA6	Lben (LbN1)	<i>E. faecalis</i>	-	-
37	LNA13	Lben (LbN1)	<i>E. faecalis</i>	-	-
38	RNC2	Rayeb (RbN3)	<i>E. durans</i>	-	-
39	RNC9	Rayeb (RbN3)	<i>E. durans</i>	-	-
40	RJ2	Rayeb (RbJ)	<i>S. equinus</i>	-	-
41	RC9	Rayeb (RbC)	<i>S. equinus</i>	-	-
42	RC13	Rayeb (RbJ)	<i>S. equinus</i>	-	-

- : non investigué, *Enterococcus* (*E*), *Streptococcus* (*S*)

De la même manière les 22 autres isolats ont été identifiés par l'analyse du même gène. Ils sont répartis en entérocoques (*E. faecalis* et *E. durans*) et streptocoques du groupe D (*S. equinus* et *S. lutetiensis*). Ces isolats ont de ce fait été définitivement écartés de la sélection.

A l'instar des entérocoques, les espèces du complexe *S. bovis* / *S. equinus* sont des indicateurs de conditions d'hygiène insuffisante. Ces espèces ont été identifiées dans des laits et des produits laitiers traditionnels africains dont certaines en sont prédominantes telle que *S. infantarius* subsp. *infantarius* (Abdelgadir *et al.*, 2008 ; Jans *et al.*, 2012, 2017 ; Bayili *et al.*, 2019) ou *S. equinus* dans le lait fermenté zambien (Schoustra *et al.*, 2013). Dans une moindre mesure, *S. lutetiensis* a été rencontrée dans un lait de chamelle fermenté traditionnel éthiopien (Berhe *et al.*, 2019) et dans des produits fermentés céréaliers nigériens (Oguntoyinbo *et al.*, 2011) ainsi que dans des fromages traditionnels italiens (Gaglio *et al.*, 2014).

Les résultats présentés dans le tableau 11 démontrent la pertinence du schéma de sélection adopté dans ce présent travail qui a permis de restreindre le nombre d'isolats aux plus représentatifs des

espèces recherchées. Ils mettent, également, l'accent sur les avantages de l'identification moléculaire en l'occurrence l'analyse du gène de l'ARNr 16S. Bien que les deux espèces soient très proches aux niveaux morphologique et physiologique, *S. macedonicus* a pu être rapidement séparée de *S. thermophilus* par l'analyse de ce gène.

De par ses propriétés et la simplicité de la mise en œuvre de son séquençage, l'ARNr 16S semble être bien adapté à l'identification des espèces de BL, souvent de manière satisfaisante, quand bien même elles seraient semblables phénotypiquement (Randazzo *et al.*, 2002 ; Yu *et al.*, 2011 ; Alessandria *et al.*, 2016).

1.2.1.1. Distribution des isolats de *Streptococcus thermophilus* dans nos échantillons

Les 20 isolats sélectionnés représentant 3% des coques lactiques thermophiles totaux proviennent de six produits distincts (15% d'échantillons). Deux isolats de *S. thermophilus* (0,3%) sont affiliés à deux échantillons de *lben* (5% d'échantillons). Ces isolats sont rencontrés à 5,8% dans un produit (1/17 isolat) et 7,7% dans l'autre (1/13).

La faible distribution de ces espèces dans nos échantillons était prévisible car il ne s'agit pas d'espèces prédominantes dans les *lben* et *rayeb* algériens notamment pour *S. thermophilus*. En dépit de la rareté des travaux réalisés sur la prévalence de ces espèces dans les produits laitiers traditionnels algériens, une faible proportion de *S. thermophilus* a tout de même été enregistrée dans les travaux de Mezaini *et al.* (2009) concernant le *rayeb* algérien et aucune souche n'a été isolée du *lben* chez Bensalah *et al.* (2009) et Ghalouni *et al.* (2018).

Dans le lait cru de chèvre issu de zones arides algériennes, la proportion de *S. thermophilus* est estimée à environ 14% d'après Guessas et Kihal (2004) et 2% d'après Cheriguene *et al.* (2006). Elle a également été rarement isolée dans des produits laitiers algériens tel que le beurre traditionnel (Bensalah *et al.*, 2011). Cette même tendance est perçue dans les produits laitiers traditionnels en général notamment le *lben* et le *rayeb* marocains, tunisiens et égyptiens. Ces produits sont caractérisés par une microflore mésophile et de ce fait, *S. thermophilus* est quasi absente dans ces produits marocains, tunisiens (Benkerroum et Tamime, 2004 ; Mennane *et al.*, 2007 ; Ouadghiri *et al.*, 2009 ; Samet-Bali et Attia, 2012), et faiblement enregistrée voire inexistante dans *rayeb* égyptien (Abd El Gawad *et al.*, 2010 ; ZMR *et al.*, 2016).

Si elle semble ainsi être une espèce sous-dominante dans les laits fermentés traditionnels nord africains, *S. thermophilus* est cependant prédominante dans ceux issus d'autres pays du même continent (Jans *et al.*, 2017) à savoir kényans (Nyambane *et al.*, 2014), éthiopiens (Gonfa *et*

al.,1999) et zambiens (Schoustra *et al.*, 2013). La proportion de *S. thermophilus* dans les produits laitiers traditionnels semble alors être variable tel que c'est le cas pour certains fromages traditionnels italiens. Elle a été faiblement détectée dans 39 échantillons de fromages labélisés appellation d'origine protégée (AOP) où elle est représentée par 15 souches sur 894 isolats (Gaglio *et al.*, 2014) alors que 274 souches ont été isolées dans quatre autres fromages du même label (Andrighetto *et al.*, 2002).

1.2.1.2. Distribution des isolats de *Streptococcus macedonicus* dans nos échantillons

S. macedonicus a été détectée avec une proportion de 2,7% des isolats initiaux dans quatre produits différents sur 40 (soit 10%). Sa proportion est relativement plus élevée que celle de *S. thermophilus* dans nos échantillons, elle est enregistrée dans deux échantillons de *lben* à hauteur de 31% (6/19 isolats) dans l'un et 5% (1/18 isolats) dans l'autre. Pareillement pour le *rayeb* où elle a été identifiée à 61% (11/18 isolats) dans un produit contre environ 5% (1/17 isolats) dans l'autre. Sa répartition semble être alors indépendante du type de produit pour ce qui est de la présente étude.

Il est à indiquer que *S. macedonicus* a été isolée surtout dans des fromages traditionnels notamment grecques et italiens. Outre, le fromage *kasseri* à pâte filée, origine de la première souche (Tsakalidou *et al.*, 1994 ; 1998), d'autres souches de *S. macedonicus* ont été détectées dans 15 échantillons sur 68, de fromages traditionnels grecques de 13 variétés différentes (Georgalaki *et al.*, 2009). Une étude portant sur la diversité du microbiote de fromages traditionnels à pâte semi-molle *feta* provenant de trois régions montagneuses différentes en Grèce a détecté *S. macedonicus* dans 6 échantillons sur 16 et aucune souche n'a pu être retrouvée dans les échantillons de fromages issus de la 3^{ème} région (Bozoudi *et al.*, 2016).

Par ailleurs, nos résultats semblent se rapprocher de ceux de Gaglio *et al.* (2014). Ces auteurs ont isolé dans 39 fromages italiens à pâte filée labélisés AOP, 894 coques lactiques dont 31 mésophiles et 43 thermophiles, ces dernières sont retrouvées dans 16 produits des 39 investigués. Parmi les coques lactiques thermophiles, 13 (soit 30%) souches appartiennent à *S. macedonicus*, qui représentent environ 1,5% des coques lactiques totaux dans ces échantillons. Fortina *et al.* (2003) ont isolé 6 souches de *S. macedonicus* parmi 116 isolats de coques lactiques (5%) dans deux échantillons des 11 fromages traditionnels italiens AOP (Fortina *et al.*, 2003). De même, dans des fromages traditionnels français portant le label appellation d'origine contrôlée (AOC), ont été isolées 3 souches de *S. macedonicus* parmi 381 isolats de BL (Callon *et al.*, 2004). Une fréquence plus élevée a cependant été notée dans d'autres fromages traditionnels italiens et grecs. Néanmoins cela ne permet pas de considérer *S. macedonicus* comme une espèce prédominante quand bien

même elle serait répandue dans ces produits (Lombardi *et al.*, 2004 ; Poznanski *et al.*, 2004 ; Pacini *et al.*, 2006 ; Georgalaki *et al.*, 2009, Fusco *et al.*, 2019).

D'autre part, en Afrique, l'espèce *S. macedonicus* a été isolée dans des laits fermentés traditionnels dont *fènè* du Mali où elle a été retrouvée à hauteur de 21,1% d'isolats dans 31,6% des échantillons. Or, elle est représentée par 5,3% d'isolats dans 6,7% d'échantillons de « lait aigre » bovins ivoirien. Dans des laits fermentés camelins *suusac* au Kenya et en Somalie, *S. macedonicus* a été identifiée dans 6,7 et 45% des échantillons à hauteur de 0,4 et 4,2% d'isolats, respectivement (Wullschleger, 2009 ; Jans *et al.*, 2012, 2013, 2017).

Ces éléments suggèrent que cette espèce pourrait être répandue en Afrique avec une prévalence variable. Toutefois, en Afrique du Nord, les travaux faisant objet de *S. macedonicus* sont presque inexistantes. Au mieux de notre connaissance, aucune étude n'a rapporté l'isolement de *S. macedonicus* dans les produits laitiers marocains, une étude en Tunisie a présenté la fabrication de lait fermenté par l'utilisation de la souche *S. macedonicus* W2 provenant de *rayeb* de dromadaire tunisien (El Hatmi *et al.*, 2018) et une autre a signalé la présence de cette espèce dans le *lben* et le fromage traditionnel algérien *bouhezza* de chèvre et de vache qui semble être dominé par *S. macedonicus* et *L. lactis* subsp *cremoris* (Medjoudj *et al.* 2017).

La faible prévalence peut être imputée à plusieurs facteurs. En effet, la prédominance de la flore lactique mésophile dans *lben* et *rayeb* algériens, et l'envahissement de la flore thermophile par les entérocoques renforcent la compétition entre les espèces. La composition du produit et les conditions de fermentations peuvent exercer une pression de sélection tels que le pH, le sel, la température, etc. (Jans *et al.* 2012).

Pour ce qui est de nos échantillons, nous n'avons pas déterminé le pH mais selon les travaux réalisés sur les *lben* et *rayeb* à Constantine, il est inférieur à 5 pour le *lben*, se situant aux alentours de 4,6 - 4,8 et il est supérieur à ces valeurs pour le *rayeb* (Zitoun *et al.*, 2011 ; 2012 ; Derouiche Belamri, 2017). D'après la littérature, la présence de 0,4% de *S. macedonicus* dans des laits fermentés ivoiriens à pH 5,5 a été signalée par Jans *et al.* (2013) alors qu'aucune souche n'a été décelée dans ces produits à pH 4,5. En revanche, dans d'autres laits fermentés africains *S. macedonicus* est isolée à pH 4,5 tandis qu'elle est absente à pH 5,1. Medjoudj *et al.* (2017) ont indiqué dans leur étude que le pH du *lben* ayant servi à la fabrication du fromage algérien *bouhezza* était de 3,8 et *S. macedonicus* prédominait dans ce produit au détriment des Lactobacilles.

D'autre part, *S. macedonicus* était initialement isolée de fromages à pâte filée, qui sont cuits à haute température (40 à 45°C) (Van den Berghe *et al.*, 2006). Etant une espèce thermophile, elle est

capable de se développer dans ce type de conditions. Malgré sa large distribution dans ces produits, la proportion de cette espèce reste variable puisqu'elle a été faiblement identifiée dans des fromages italiens à pâte filée par rapport à d'autres échantillons de fromages italiens et grecques du même type (Pacini *et al.*, 2006 ; Georgalaki *et al.*, 2009 ; Gaglio *et al.*, 2014). Elle a également été fortement identifiée dans le fromage traditionnel algérien qui ne subit pas de traitement thermique ainsi que dans des laits fermentés traditionnels africains (Jans *et al.*, 2017 ; Medjoudj *et al.*, 2017).

Ces éléments suggèrent qu'en dehors des caractéristiques intrinsèques des souches/espèces et leurs capacités d'adaptation aux environnements (pH, température, etc.) et de défense (bactériocine), les facteurs pouvant influencer le développement des souches/espèces dans une matrice alimentaire ne doivent pas être pris isolément. D'autres conditions liées à l'animal à savoir l'origine, l'élevage, l'alimentation et la traite, le processus de fabrication ainsi que les conditions climatologiques et géographiques doivent également, être pris en compte (Georgalaki *et al.*, 2009 ; Jans *et al.*, 2012 ; O'Sullivan et Cotter, 2017).

1.2.2. Analyse de l'espace intergénique 16S-23S

Dans le présent travail, l'analyse de l'espace intergénique 16S-23S (ITS) a été envisagée dans le but de compléter les résultats obtenus par l'analyse du gène de l'ARNr 16S pour conforter l'identification à l'échelle de l'espèce, voire d'identifier les différents isolats au niveau de la souche. Cette région variable est située entre les régions codant les ARNr 16S et 23S dont la longueur dépend de l'espèce. L'analyse des ITS 16S-23S est très utilisée pour l'identification bactérienne, différentes espèces et souches de BL ont d'ailleurs été efficacement différenciées par l'analyse de cette séquence (Mora *et al.*, 2003 ; Adesulu-Dahunsi *et al.*, 2017).

1.2.2.1. Isolats de *Streptococcus thermophilus*

Les résultats auxquels a abouti l'analyse ITS 16S-23S a permis de confirmer l'appartenance de nos isolats aux espèces identifiées tout en distinguant ceux de *S. thermophilus* selon le type d'ITS. *S. thermophilus* LF9 présente le type I (100% de similarité avec les souches *S. thermophilus* MN-ZLW-002 et *S. thermophilus* CNRZ1066) et *S. thermophilus* LA14 affiche le type II (100% de similarité avec les souches *S. thermophilus* LMD-9 et *S. thermophilus* JIM 8232) (tableau 11).

Il faut savoir que malgré les avantages du gène de l'ARNr 16S dans l'identification des genres et des espèces, celui-ci est souvent combiné à d'autres outils moléculaires pour un meilleur pouvoir discriminant. Fortina *et al.* (2003), ont identifié des espèces et des souches isolées de fromages traditionnels italiens en combinant l'analyse des séquences 16S-23S à celles de l'ARNr 16S. De

même, Maeda *et al.* (2011) ont distingué différentes espèces de streptocoques en associant au gène de l'ARNr 16S d'autres marqueurs moléculaires dont l'ITS 16S-23S.

L'analyse ITS 16S-23S a été employée par Mora *et al.* (2003) pour la discrimination des souches de *S. thermophilus* en mettant en évidence quatre types d'ITS différents. Galia *et al.* (2009) ont identifié trois types d'ITS dans une collection de *S. thermophilus* et ils ont mis en évidence un nouvel allèle ITS différent de ceux retrouvés par Mora *et al.* (2003). De même, l'analyse de cette séquence intergénique a permis de distinguer plusieurs espèces de BL dont *S. thermophilus* et *S. macedonicus* issues de fromages traditionnels italiens et slovaques ainsi que des espèces aux phénotypes atypiques (Fortina *et al.*, 2003 ; Chebeňová-Turcovská *et al.*, 2011).

1.2.2.2. Isolats de *Streptococcus macedonicus*

Les 18 isolats de *S. macedonicus* ont la même séquence ITS que celle de la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 et de ce fait n'ont pas pu être différenciés.

L'analyse de la région 16S-23S a conduit, dans les travaux de Tsakalidou *et al.* (1998), à une claire distinction entre *S. macedonicus*, *S. thermophilus* et d'autres espèces du complexe *S. bovis/S. equinus*. De la même manière, une nette discrimination de l'espèce *S. macedonicus* par analyse de ce marqueur a également été soulignée par Papadelli *et al.* (2003). D'autre part, le même type d'ITS a été observé pour cinq souches de *S. macedonicus* (LMG18487^T, LMG15061, ASG 38, ASG 62 et M30) et *S. waius* NZRCC 20100 d'origine laitières isolées de différentes zones géographiques Italie, Grèce et Nouvelle-Zélande (Manachini *et al.*, 2002).

Ce marqueur semble alors fournir une identification efficace de l'espèce *S. macedonicus* mais une discrimination moins évidente au niveau des souches de cette espèce en raison d'une faible diversité de cette séquence dans nos isolats et probablement au sein de l'espèce *S. macedonicus*.

1.2.3. Analyse de la séquence du gène *sodA*

Au regard des limites de l'analyse de l'espace intergénique ITS dans la différenciation des isolats de *S. macedonicus*, nous avons opté pour l'analyse de la séquence du gène codant la superoxyde dismutase *sodA*. Celui-ci est fréquemment ciblé dans les protocoles d'identification génétique des streptocoques, il est considéré plus discriminant que le gène de l'ARNr 16S pour les espèces de ce genre, à l'instar du gène *rpoB* pour les entérobactéries (Glazunova *et al.*, 2009 ; Maeda *et al.*, 2011).

Proposée par Poyart *et al.* (1998), le séquençage du *sodA* a permis d'établir des liens phylogénétiques entre des espèces de streptocoques avec une différenciation au niveau de la sous-espèce bouleversant en l'occurrence la taxonomie du complexe *S. bovis* / *S. equinus* (Poyart *et al.*, 1998, 2002 ; Hinse *et al.*, 2011). De surcroît, l'analyse de la séquence du gène *sodA* a été utilisée avec succès dans le cadre d'un schéma MLST (*Multi-locus Sequence Typing*), pour différencier des souches de *S. salivarius* et *S. vestibularis*. Le pourcentage de divergence de ce gène était de 4,9% pour les souches de *S. salivarius* et de 0,7% pour celles de *S. vestibularis* (Delorme *et al.*, 2007).

En ce qui concerne notre étude, les 18 isolats de *S. macedonicus* avaient la même séquence du gène *sodA* et étaient à 100% identiques à la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 (tableau 11). Bien qu'il ait été suffisamment discriminant au niveau de l'espèce, de la sous-espèce et de la souche du genre *Streptococcus*, ce gène n'a pas permis d'établir une distinction entre nos isolats, éventuellement assez proches, nous avons eu recours à une autre méthode de typage à savoir la *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD).

1.2.4. Résultats de l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD)

La RAPD est fréquemment employée pour le typage moléculaire des souches bactériennes. Elle est notamment appliquée aux BL pour l'identification des espèces proches et la mise en évidence de divergences à l'intérieur des espèces. Elle a d'ailleurs été utilisée avec succès pour différencier des souches de *S. thermophilus* et *S. macedonicus* dans plusieurs travaux mettant en exergue la diversité de ces deux espèces (Giraffa *et al.*, 2001 ; Mora *et al.*, 2002 ; Lombardi *et al.*, 2004 ; Blaiotta *et al.*, 2011 ; Franciosi *et al.*, 2009 ; Ghazi *et al.*, 2016).

Les résultats obtenus par la méthode RAPD dans ce présent travail étaient non concluants pour les isolats de *S. macedonicus*. Plusieurs concentrations d'ADN génomique et d'amorce ont été testées mais ces tentatives étaient infructueuses, pourtant l'amorce XD9 utilisée a montré une bonne discrimination au niveau des souches des deux espèces *S. thermophilus* ou *S. macedonicus* dans les travaux de Blaiotta *et al.* (2011). Cette méthode est en effet, assez sensible aux conditions telles que la variation de concentrations et la qualité de l'ADN ainsi que des composants de PCR, elle peut dépendre également de la marque de la taq polymérase et celle du thermocycleur (Saunders *et al.*, 2001 ; Skorić *et al.*, 2012 ; Ghazi *et al.*, 2013 ; 2016).

Le seul profil électrophorétique obtenu avec quatre isolats de *S. macedonicus* issus de quatre produits différents permettrait de visualiser une différence entre *S. macedonicus* PA et les trois autres isolats *S. macedonicus* LS5, *S. macedonicus* LK13 et *S. macedonicus* P2 comme le montre la figure 12. Bien que cette différence ne soit pas claire du fait de la faible qualité du gel et que ce

résultat ne soit pas reproductible par RAPD, cette méthode a, tout de même, le mérite de fournir une indication sur une éventuelle divergence entre les quatre isolats de *S. macedonicus*. La confirmation de ce résultat a été envisagée par l'application d'une autre méthode de typage moléculaire.

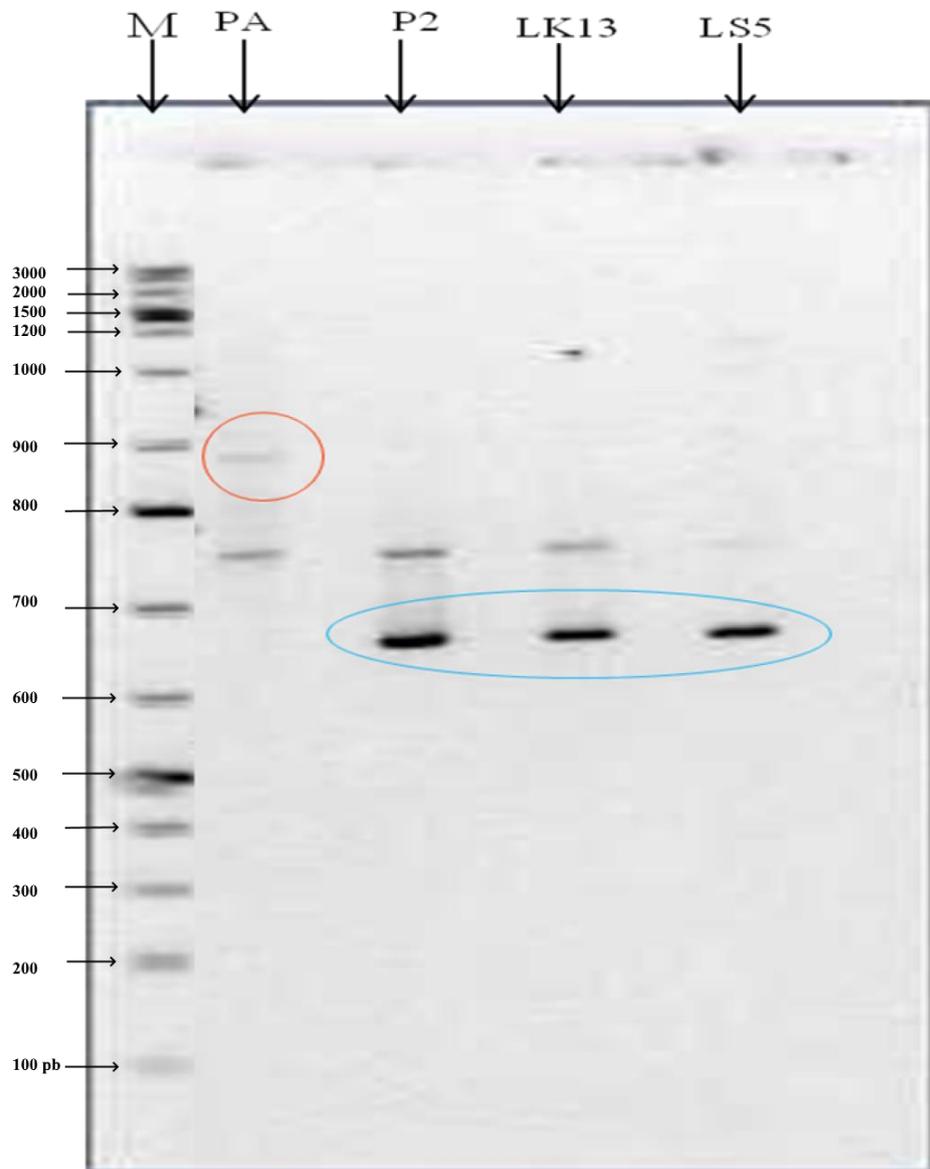


Figure 12. Profil électrophorétique (RAPD) pour les quatre souches de *S. macedonicus*

M : marqueur de taille

1.2.5. Résultats de la méthode MLST et étude phylogénétique

Il est à rappeler que le potentiel probiotique dépend de la souche, il est dès lors, nécessaire d'identifier avec fiabilité au niveau de celle-ci les isolats sélectionnés dans cette étude. Une

méthode de typage reproductible et discriminante à savoir MLST, a été adoptée dans cette étude pour caractériser nos isolats de *S. thermophilus* et *S. macedonicus*.

Cette approche a été proposée d'abord pour caractériser sans ambiguïté des bactéries pathogènes en l'occurrence *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998). Par la suite, elle a été étendue à l'étude des BL. La méthode MLST a été efficacement appliquée pour la caractérisation génotypique des souches de *Lb. casei* isolées de différentes niches écologiques, dans des fromages de différentes régions géographiques et pour l'identification des souches de *Lactobacillus* d'origine humaine, animale, et alimentaire (lait, yaourt et fromage) (Tsakalidou, 2011).

Cette méthode permet notamment d'estimer la diversité génétique inter et intra espèces. C'est ainsi que Delorme *et al.* (2007 ; 2010 ; 2015) ont pu mettre en évidence une variabilité génétique entre des souches de *S. salivarius* et *S. vestibularis* ainsi qu'entre 27 souches de *S. thermophilus* issues de différentes origines tout en clarifiant la place de cette espèce dans le groupe *Salivarius*. De la même manière, Yu *et al.* (2015) et Junjua *et al.* (2016) ont distingué par MLST, respectivement 257 et 30 souches de *S. thermophilus*. Le schéma MLST a également été développé pour les membres du complexe *S. bovis* / *S. equinus* et a permis de déterminer avec succès les sous espèces de *Streptococcus gallolyticus* et de souligner une variabilité génétique inter- et intra-espèces des membres de ce complexe (Shibata *et al.*, 2014 ; Jans *et al.*, 2016). De ce fait, une étude MLST a été entreprise pour nos isolats de *S. thermophilus* et *S. macedonicus*.

1.2.5.1. Cas des isolats de *Streptococcus thermophilus*

Pour les isolats de *S. thermophilus* LF9 et *S. thermophilus* LA14, le séquençage de fragments internes (472 à 568 pb) de neuf gènes de ménage *glcK*, *ddlA*, *pepO*, *ilvC*, *thrS*, *tkt*, *pyrE*, *dnaE*, et *serB*, selon Delorme *et al.* (2010) ; El-Sharoud *et al.* (2012) et Junjua *et al.* (2016). Dans ces deux isolats révèle un pourcentage maximal de divergence des séquences allant de 0,2% pour les gènes *thrS* et *pyrE*, 0,5% et 0,6% pour les gènes *pepO* et *serB* à 1,2% pour le gène *glcK* tel que présenté dans le tableau 12.

Cette faible diversité dans les souches de *S. thermophilus* a été également observée dans les travaux de Delorme *et al.* (2010) et de Junjua *et al.* (2016) à un niveau relativement plus élevé. Pour Delorme *et al.* (2010), le pourcentage maximal de divergence de 27 séquences nucléotidiques atteint 1,7% au niveau du locus *glcK* pour des souches de *S. thermophilus* de diverses origines géographiques (France, Inde, Italie, Mongolie, Grèce, Bulgarie, etc.) rassemblées sur une période de 40 ans (1962 à 2002). Dans la collection des 30 souches *S. thermophilus* de Junjua *et al.* (2016), le

maximum de divergence atteint un pourcentage de 2,6% pour le gène *serB* et le même profil allélique est observé pour près de la moitié de nos isolats.

Malgré la faible divergence entre nos deux isolats, *S. thermophilus* LF9 présente un profil allélique différent de celui de *S. thermophilus* LA14 et des profils des 30 souches de la collection de Junjua *et al.* (2016). De plus, l'allèle 10 attribué à la séquence de *S. thermophilus* LF9 au niveau du locus *serB* correspondant à celui attribué par El-Sharoud *et al.* (2012) mais inexistant dans la collection de Junjua *et al.* (2016). Il est à souligner que l'utilisation du marqueur *serB* par El-Sharoud *et al.* (2012) a permis de distinguer dix allèles dans une collection de 54 souches de *S. thermophilus* de différentes sources laitières et origines géographiques d'Égypte. En revanche, *S. thermophilus* LA14 exhibe le même profil allélique que celui de la souche *S. thermophilus* LMD-9 (tableau 13).

Tableau 12. Variabilité génétique au niveau des neuf loci étudiés par MLST pour l'espèce *S. thermophilus* (adapté de Junjua *et al.*, 2016)

Locus	Longueur de séquence (pb)	Nb. de site variable pour <i>S. thermophilus</i> LF9 et LA14	Maximum % de divergence pour <i>S. thermophilus</i> LF9 et LA14	Maximum % de divergence au sein de la collection <i>S. thermophilus</i> de Junjua <i>et al.</i> (2016)	Maximum % de divergence au sein de la collection <i>S. thermophilus</i> Delorme <i>et al.</i> (2010)
<i>glcK</i>	488	6	1,2	0,6	1,7
<i>ddlA</i>	472	0	0	0,6	0,4
<i>pepO</i>	583	3	0,5	0,5	0,4
<i>ilvC</i>	476	0	0	0,2	0,2
<i>thrS</i>	518	1	0,2	0,2	0,6
<i>tkt</i>	568	0	0	0,7	1
<i>pyrE</i>	546	1	0,2	1,3	1,2
<i>dnaE</i>	491	0	0	0,2	0,6
<i>serB</i>	498	3	0,6	2,6	-

serB n'est pas séquencé dans la collection de Delorme *et al.* (2010)

En outre, l'arbre phylogénétique est construit avec les séquences concaténées de neuf gènes de ménage, d'une longueur totale de 4640 pb relatives à nos deux isolats, aux 30 souches de *S. thermophilus* de la collection du laboratoire URAFPA et à trois souches de *S. salivarius*. Cet

arbre permet de visualiser une claire distinction de *S. thermophilus* LF9 de l'isolat *S. thermophilus* LA14, (identique à *S. thermophilus* LMD-9) et des 30 autres souches de cette espèce inclut dans l'étude phylogénétique (figure 13).

Tableau 13. Allèles (MLST) des isolats *S. thermophilus* LF9 et LA14 par rapport à la collection de 30 souches de *S. thermophilus* de Junjua *et al.* (2016)

Souche	Origine	No. Allèle								
		<i>glcK</i>	<i>ddlA</i>	<i>pepO</i>	<i>ilvC</i>	<i>thrS</i>	<i>tkl</i>	<i>pyrE</i>	<i>dnaE</i>	<i>serB</i>
ATE11PB6MJ	Yaourt	1	1	2	1	2	7	5	1	3
EBL1066	Yaourt	1	2	3	2	2	3	8	2	7
CNRZ160	Yaourt	2	2	4 ou 1	1	1	3	1	1	2
CNRZ21	Yaourt	5	2	4 ou 1	1	1	1	3	1	4
CNRZ302	Fromage	1	2	3	2	2	3	6	1	3
CNRZ391	Yaourt	1	1	2	1	2	7	5	1	3
CNRZ455	Inconnu	1	1	2	1	2	7	5	1	3
EBLHAD17	Yaourt	1	2	4 ou 1	1	1	1	3	1	4
EBLHAD8α	Yaourt	1	2	4 ou 1	2	1	1	3	1	18
EBL307	Fromage	1	1	2	1	2	7	5	1	3
EBL308	Fromage	2	N	N	1	1	4	6	2	3
EBL385	Fromage	1	2	3	2	2	3	6	1	3
EBL404	Yaourt	1	1	2	1	2	7	5	1	3
EBL407	Yaourt	1	1	2	1	2	7	5	1	3
EBL445	Fromage	1	1	2	1	2	7	5	1	3
EBLST19	Yaourt	1	1	4 ou 1	1	2	2	6	1	25
EBLST20	Yaourt	1	1	2	1	2	7	5	1	3
EBLY4	Yaourt	1	1	2	1	2	7	5	1	3
4F44	Fromage	1	2	4 ou 1	1	2	3	6	1	3
LMD9	Yaourt	1	1	2	1	2	7	5	1	3
LMG18311	Yaourt	1	2	4 ou 1	1	2	1	3	1	1
PB18	Fromage	1	1	2	1	2	7	5	1	3
PB302	Yaourt	1	1	2	1	2	7	5	1	3
PB385	Yaourt	1	1	2	1	2	7	5	1	3
PB5MJ	Yaourt	1	1	2	1	2	7	5	1	3
ST14	Yaourt	3	2	4 ou 1	1	1	8	13	1	9
ST88	Fromage	1	1	2	1	2	7	5	1	3
WG19258	Milk	1	2	3	2	2	3	8	2	7
LF9	<i>Lben</i>	7	1	4	1	1	7	6	1	10
LA14	<i>Lben</i>	1	1	2	1	2	7	5	1	3

N : nouvel allèle

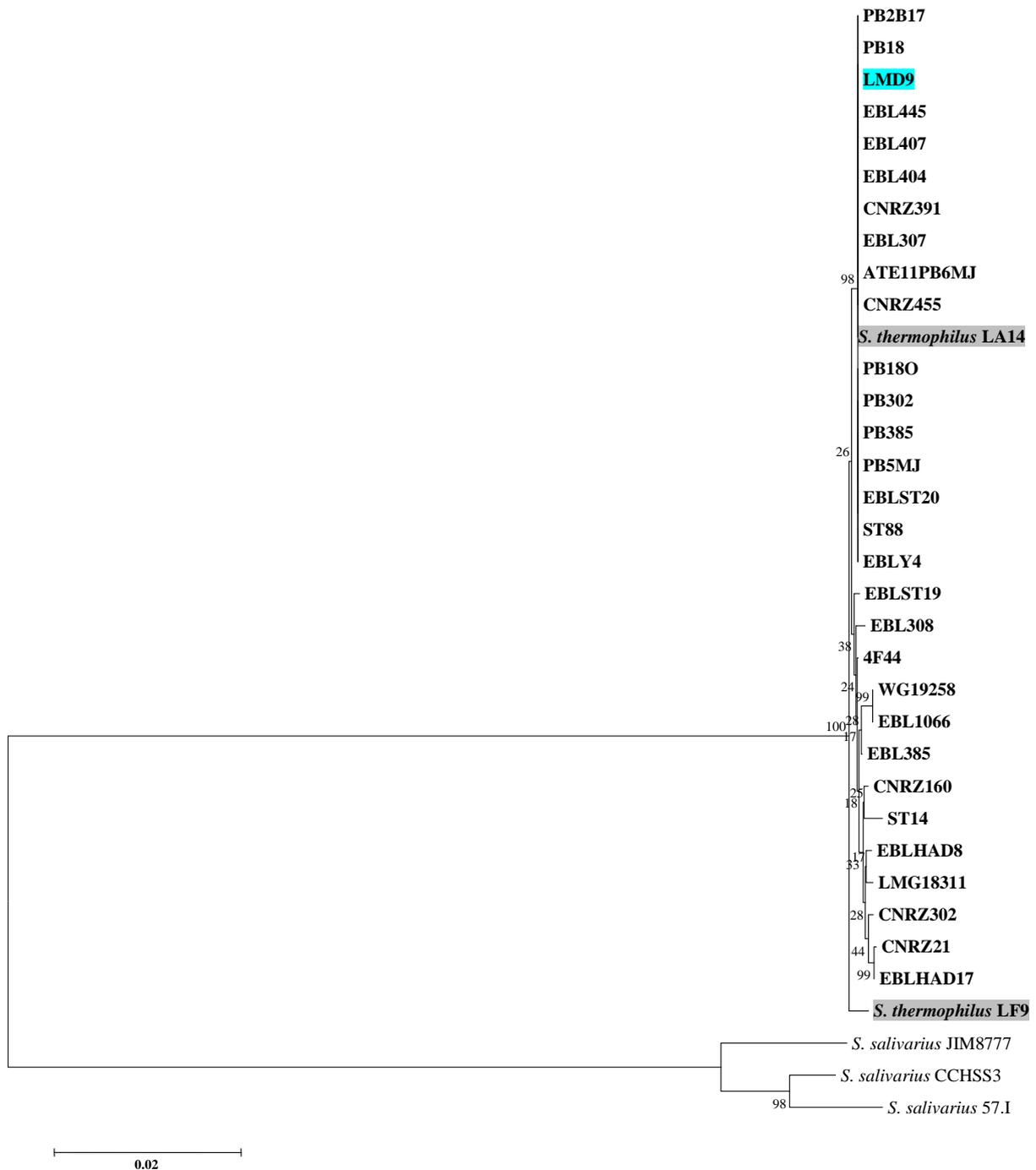


Figure 13. Liens phylogénétiques des isolats *S. thermophilus* LF9 et *S. thermophilus* LA14 parmi 30 souches de cette espèce et trois souches de *S. salivarius* (adapté de Junjua *et al.*, 2016)

Liens basées sur les séquences de 9 gènes de ménage (*glcK*, *ddlA*, *pepO*, *ilvC*, *thrS*, *tkl*, *pyrE*, *dnaE*, et *serB*), alignées par la méthode ClustalW. L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode du Neighbor-Joining basée sur le modèle de Tamura-Nei (Tamura et Nei 1993). Les valeurs du bootstrap sont montrées sur les nœuds correspondants.

De même, une variabilité génétique relativement faible au sein de 239 souches de *S. thermophilus* issues de différentes régions de Mongolie et de Chine en comparaison avec 18 souches de référence a été rapportée par Yu *et al.* (2015) avec 119 profils alléliques différents (soit 46%) ce qui est à peu près retrouvé dans la collection de Junjua *et al.* (2016) contre 77% pour la collection de Delorme *et al.* (2010). Yu *et al.* (2015) ont souligné un nombre d'allèles compris entre 8 et 18 pour les 257 souches étudiées, ce qui est supérieur à ceux observés dans les collections de Delorme *et al.* (2010) et de Junjua *et al.* (2016) et qui sont respectivement, compris entre 2 et 13 et entre 2 et 8. La mise en évidence d'une telle diversité allélique par Yu *et al.* (2015) pourrait s'expliquer par le nombre de souches explorées par ces auteurs qui est environ 9 fois supérieur à celui des collections étudiées par Delorme *et al.* (2010) et Junjua *et al.* (2016). De plus Yu *et al.* (2015) avaient adopté d'autres gènes dans le schéma MLST probablement plus polymorphes pour les 239 souches testées. Or, une très faible diversité, visible sur l'arbre phylogénétique, a été notée pour les 18 souches *S. thermophilus* de référence (Italie, France, Angleterre, Hollande, Chine, USA) étudiées avec les mêmes gènes par ces auteurs.

1.2.5.2. Cas des isolats de *Streptococcus macedonicus*

Les 18 isolats de *S. macedonicus* originaires de quatre produits différents, n'ont pas pu être différenciés par les marqueurs génétiques utilisés précédemment. En tenant compte de la forte probabilité que les isolats provenant du même produit correspondent à des copies multiples de la même souche, nous avons choisi de nous intéresser à un isolat par produit. Dès lors, un schéma MLST a été développé pour les quatre isolats de *S. macedonicus* (LK13, LS5, PA et P2) provenant de quatre produits différents (LbK1, LbS, Rb1FP et Rb2FP) en ciblant des gènes qui se sont avérés discriminants pour des souches de *S. thermophilus* et de *S. gallolyticus*, surtout que *S. macedonicus* constitue une sous-espèce d'origine laitière du complexe *S. bovis* / *S. equinus* (Delorme *et al.*, 2010 ; El-Sharoud *et al.*, 2012 ; Shibata *et al.*, 2014 ; Junjua *et al.*, 2016).

Seize gènes de ménage ont ainsi été séquencés dans les quatre isolats de *S. macedonicus*. Aucune différence n'a été notée pour six gènes: *glcK*, *pepO*, *thrS*, *tkl*, *pyrE* et *dnaE*, avec une identité de séquence de 100% entre les quatre isolats et la souche de référence *S. macedonicus* ACA-DC 198 (Papadimitriou *et al.*, 2012). Ces derniers gènes étaient écartés de l'étude MLST.

Les séquences nucléotidiques de fragments internes de 363 à 842 pb ont été déterminées pour les dix autres loci (*ddlA*, *ilvC*, *serB*, *dpr*, *gmk*, *rpoD*, *parC*, *pta*, *pyrC* et *recN*). La diversité des séquences au niveau des gènes pour *S. macedonicus* permet de distinguer deux à trois allèles par locus et le pourcentage maximal de divergence des séquences nucléotidiques de ces isolats va

de 0,2% au locus *rpoD* et *serB* à 1,5% au locus *pyrC*. Parmi ces gènes, *pyrC* est celui qui comporte le plus grand nombre et la plus grande proportion (7 sites, 1.5%) de sites polymorphes, suivi par *ddlA* (6 sites, 0.7%). Les gènes *rpoD* et *serB* sont les moins polymorphes (2 sites, 0,2%). Ces résultats sont exprimés dans le tableau 14. De plus cinq profils alléliques différents sont représentés par nos isolats et la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 utilisée dans cette étude et sont résumés dans le tableau 15.

L'analyse phylogénétique des séquences concaténées de longueur totale de 5126 pb a donné lieu à l'arbre présenté dans la figure 14. Cette analyse a révélé une nette séparation des espèces *S. macedonicus* et *S. gallolyticus*, étayée par des valeurs bootstrap significatives et une séparation nette entre nos isolats et la souche de référence. En outre, parmi nos isolats, une distinction de la souche *S. macedonicus* PA des trois autres est visible sur l'arbre phylogénétique.

Nos isolats, partageant une même aire géographique présentent un faible degré de variabilité génétique, probablement qu'ils ont été soumis aux mêmes pressions de sélection de l'environnement. D'ailleurs, le caractère peu polymorphe des souches *S. macedonicus* a été mis en évidence par Jans *et al.* (2016), qui ont décelé par MLST une diversité génétique très faible des souches de *S. macedonicus* provenant de différentes origines (grecque, somalienne, ivoirienne et malienne), mais visible sur l'arbre phylogénétique, avec une distinction des souches africaines de la souche grecque. De même, nos quatre souches algériennes constituent une entité génétique distincte de la souche grecque *S. macedonicus* ACA-DC-198. Lombardi *et al.* (2004) et Blaiotta *et al.* (2011) avaient également mis en exergue une diversité génétique parmi les souches de *S. macedonicus* de différentes origines, caractérisées par RAPD.

Tableau 14. Diversité génétique au niveau des dix loci de *S. macedonicus*

Locus	Longueur de séquence (pb)	Nb. de site variable	No. allèles	% maximum de divergence pour <i>S. macedonicus</i>
<i>pyrC</i>	477	7	3	1,5
<i>ilvC</i>	776	3	3	0,4
<i>pta</i>	466	2	3	0,4
<i>recN</i>	400	3	2	0,7
<i>ddlA</i>	842	6	2	0,7
<i>dpr</i>	363	2	2	0,5
<i>gmK</i>	415	2	2	0,4
<i>parC</i>	462	2	2	0,4
<i>rpoD</i>	435	1	2	0,2
<i>serB</i>	490	1	2	0,2

Tableau 15. Profils alléliques obtenu par étude MLST des quatre isolats de *S. macedonicus* et de la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 (Papadimitriou *et al.* 2012)

Souche <i>S. macedobicus</i>	Origine	No. allèle.									
		<i>pyrC</i>	<i>ilvC</i>	<i>pta</i>	<i>recN</i>	<i>ddlA</i>	<i>dpr</i>	<i>gmK</i>	<i>parC</i>	<i>rpoD</i>	<i>serB</i>
PA	<i>Rayeb</i> (Rb1FP)	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2
P2	<i>Rayeb</i> (Rb2FP)	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
LS5	<i>Lben</i> (LbS)	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
LK13	<i>Lben</i> (LbK1)	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2
ACA-DC 198	Fromage Kasseri	3	3	3	2	1	1	1	1	2	1

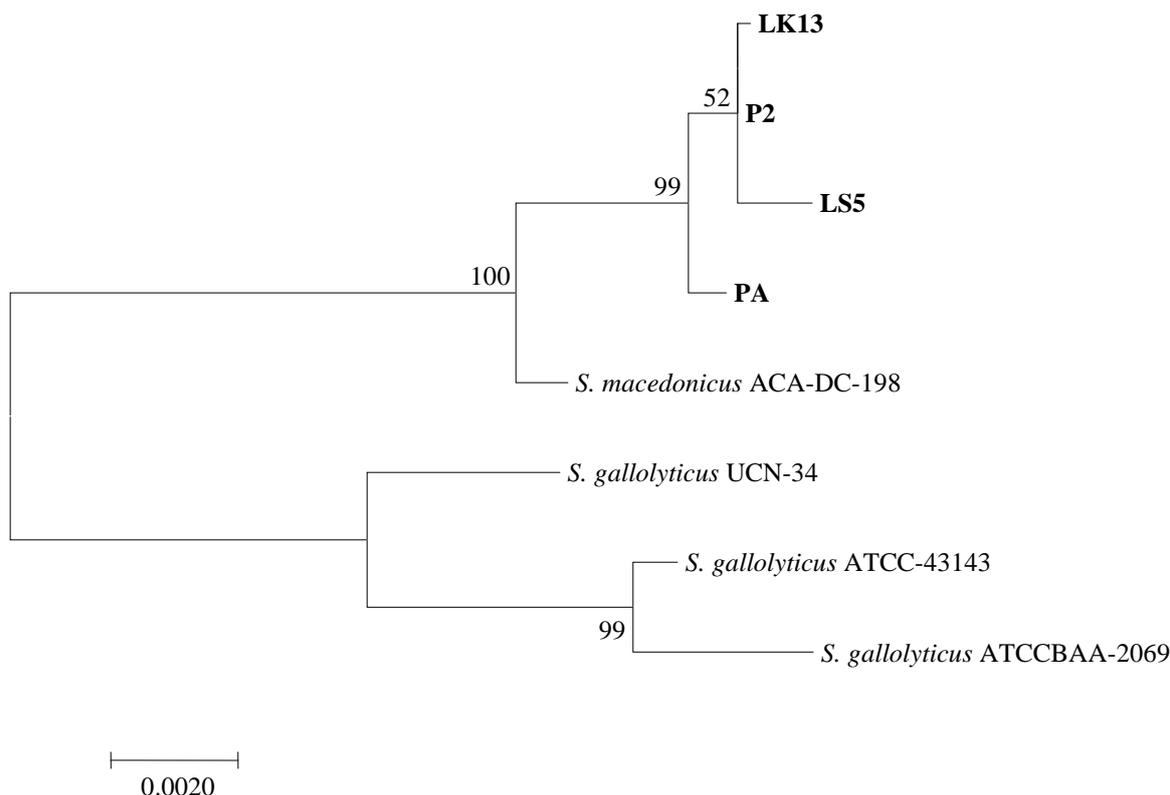


Figure 14. Liens phylogénétiques entre les souches de *S. macedonicus* (LK13, P2, LS5, PA et ACA-DC 198) et trois souches de *S. gallolyticus*

Liens basées sur les séquences de dix gènes de ménage (*ddlA*, *ilvC*, *serB*, *dpr*, *gmk*, *rpoD*, *parC*, *pta*, *pyrC* et *recN*), alignées par la méthode ClustalW. L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance basée sur le modèle de Tamura-Nei (Tamura et Nei 1993). Les valeurs du bootstrap sont montrées sur les nœuds correspondants.

En effet, le lien entre origine géographique et diversité génétique a été relevé pour de nombreuses espèces. Pour *L. lactis*, une grande diversité a été observée par MLST pour des souches issues de différentes régions de Chine, la corrélation de l'évolution de cette espèce à l'origine géographique a été démontrée (Xu *et al.*, 2014). Jans *et al.* (2016) ont également observé au cours de l'analyse phylogénétique une claire différenciation des souches de *S. infantarius* subsp. *infantarius* issues de sources laitières originaires d'Afrique de l'Est, affichant une faible variabilité des profils alléliques pour la majorité des souches, de celles provenant d'Afrique de l'Ouest et d'Asie.

Cependant, ce lien n'est pas toujours évident pour certaines espèces où la diversité de l'origine géographique des souches n'est pas forcément corrélée à une forte variabilité génétique tel que cela a été démontré pour *S. thermophilus*. Il est toutefois, utile de rappeler qu'en dépit d'une faible

diversité de cette espèce, des souches isolées dans la même région du centre de la Mongolie ont présenté le plus de profils alléliques différents. De la même manière, aucune corrélation entre l'origine géographique d'isolement et la diversité génétiques n'a été indiquée pour des souches de *S. macedonicus* d'origine laitières étudiées par Lombardi *et al.* (2004) ou encore des souches de *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* et *S. infantarius* subsp. *infantarius* humaines et animales testées par MLST dans les travaux de Dumke *et al.* (2014) et Jans *et al.* (2016).

Toutefois, une plus forte variabilité génétique intra-espèce a été indiquée pour *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* et *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* considérées comme des sous espèces, au même titre que *S. macedonicus*, de l'espèce *S. gallolyticus*. Selon Shibata *et al.* (2014), Dumke *et al.* (2014) et Jans *et al.* (2016), la proportion de sites polymorphes pour l'ensemble des membres du complexe *S. bovis* / *S. equinus* se situe environ entre 2% et 11%. Cette proportion est nettement inférieure à celle d'autres espèces telle que *S. salivarius* qui peut présenter un pourcentage de divergence au niveau de la souche de 45%.

2. Caractérisation des isolats sur la capacité d'acidification en lait

En parallèle au génotypage de nos isolats de *S. thermophilus* et *S. macedonicus*, nous avons testé leur capacité acidifiante en lait. Outre l'importance de cette propriété dans la fermentation en technologie laitière, sa caractérisation permettrait, éventuellement, de différencier et de trier nos isolats d'un point de vue biochimique. Herve-Jimenez *et al.* (2008) ont indiqué que des souches de *S. thermophilus* qui se ressemblent du point de vue génétiques, avaient des comportements différents en lait.

L'acidification du lait par les BL ne dépend pas uniquement de leur métabolisme de lactose pour transformer le lactose en acide lactique mais elle est également liée à leur capacité à croître dans ce milieu pauvre en acides aminés et en petits peptides libres. Etant auxotrophes pour certains acides aminés, les BL doivent dégrader les caséines pour générer ces acides aminés et assurer leur développement en lait, ce qui se traduit par une augmentation de la vitesse d'acidification de celui-ci. Dans ce contexte, la croissance de nos isolats de *S. thermophilus* et de *S. macedonicus* dans du lait supplémenté ou non en bacto-tryptone a été suivie par mesure du pH. Le lait est un milieu de choix qui permet d'apprécier l'activité acidifiante de nos isolats et de les classer selon celle-ci.

2.1. Acidification du lait non enrichi

La variation de pH (Δ pH) qui correspond à la différence de valeurs de pH du lait obtenues au temps d'incubation t_0 et à un instant t a servi à classer les souches de BL selon leur vitesse d'acidification pendant les premières heures de fermentation dans plusieurs travaux. Beresford *et al.* (2001), qualifient les souches de BL de fortement acidifiantes pouvant être employées en fermentation du lait pour la fabrication de fromage lorsque la variation de pH en lait est inférieure à 5,3 (soit une variation de pH de plus de 1,4 unité) au bout de 6 h d'incubation. Cette classification a été également employée par Lombardi *et al.* (2004) pour des souches de *S. macedonicus* en considérant les temps d'incubation de 3, 6 et 24 h. Nieto-Arribas *et al.* (2009) et Lairini *et al.* (2014) considèrent qu'une variation de pH de 0,4 unité dans le lait en moins de 3h d'incubation est un indice d'une grande vitesse d'acidification. Si cette valeur est obtenue entre 3 h et 5 h, la vitesse d'acidification est moyenne et au-delà de 5 h, l'acidification est alors lente.

En revanche, Georgalaki *et al.* (2000) ont observé la valeur de pH finale en lait obtenue au bout de 6h d'incubation pour conclure de la capacité d'acidification des souches de *S. macedonicus*. De la même façon, Blaiotta *et al.* (2011) ont classé arbitrairement les souches de *S. macedonicus* et *S. thermophilus* selon la valeur de pH atteint au bout de 6 h d'incubation dans le lait en trois catégories : souches fortement acidifiantes (valeurs de pH < 5,0) ; modérément acidifiantes (valeurs de pH comprises entre 5,0 et 6,0) et faiblement acidifiantes (valeurs de pH > 6,0).

2.1.1. Acidification du lait par les isolats de *Streptococcus thermophilus*

Un pH final de 4,3 au bout de 8 h d'incubation (pH 4,6 en 6 h) est obtenu en lait pour *S. thermophilus* LA14 et la souche de référence *S. thermophilus* LMD-9, tandis que le pH est maintenu à 5,6 (pH 5,8 en 6 h) pour l'isolat *S. thermophilus* LF9 (figure 15).

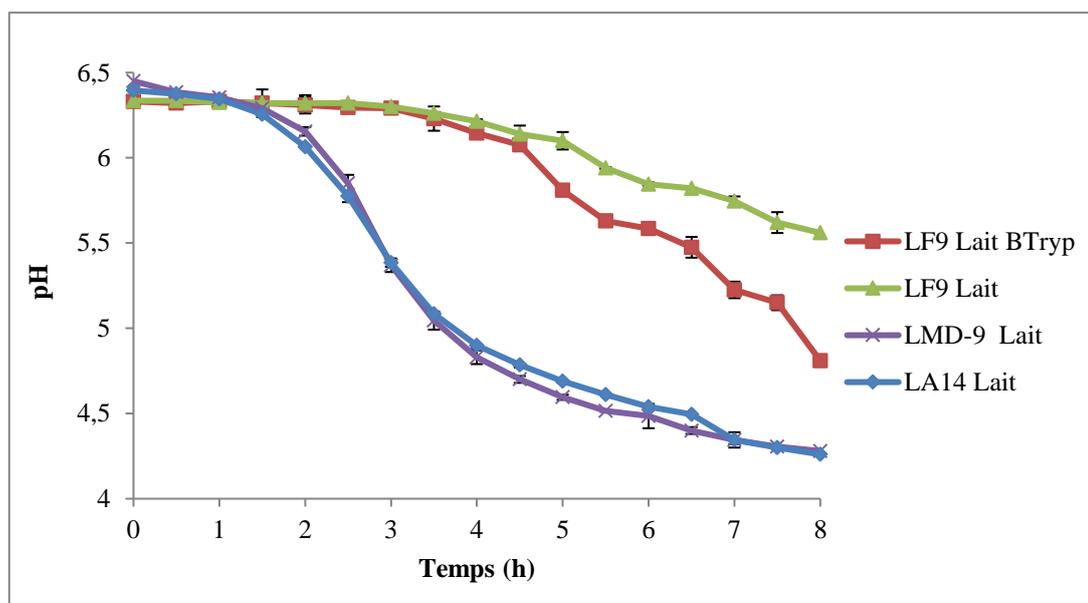


Figure 15. Cinétiques d'acidification en lait avec ou sans bacto-tryptone des isolats *S. thermophilus* LF9, LA14 et de la souche de référence *S. thermophilus* LMD-9

Les moyennes \pm SEM de deux expériences en duplicatas indépendants sont présentées.

En se référant au classement de Georgalaki *et al.* (2000), Lombardi *et al.* (2004), Blaiotta *et al.* (2011) et Lairini *et al.* (2014), nous pouvons qualifier *S. thermophilus* LF9 de faiblement acidifiant, la variation de 0,4 unité de pH est atteinte au-delà de 5 h d'incubation et le pH final étant proche de 6. Il a été rapporté que bien que cette espèce compte des souches fortement acidifiantes telle que *S. thermophilus* LMD-9, de nombreuses souches de *S. thermophilus* affichent la même tendance d'acidification en lait que notre isolat *S. thermophilus* LF9. Parmi 28 souches de *S. thermophilus* étudiées par Galia *et al.* (2009), 18 étaient considérées comme moyennement à faiblement acidifiantes. Blaiotta *et al.* (2011) ont détecté dans leur collection de *S. thermophilus*, 84% de souches avec un niveau d'acidification modéré à faible (respectivement, 48% et 36%). Il en est de même pour Morandi *et al.* (2012) qui ont identifié 79% de souches *S. thermophilus* faiblement acidifiantes.

Cette faible capacité d'acidification du lait pourrait être liée en partie à une faible activité protéolytique de surface. L'activité de la protéase PrtS permet de favoriser la croissance des souches dans le lait, composé de protéines complexes (caséines), alors qu'elle n'est pas requise pour le développement dans un milieu enrichi en acides aminés libres directement accessibles.

La souche de référence *S. thermophilus* LMD-9 exprime la protéase active PrtS, codée par le gène *prtS*, qui lui permet de croître et d'acidifier rapidement le lait dans les mêmes conditions que celles de *S. thermophilus* LF9. Chez ce dernier, le gène *prtS* semble être absent puisqu'il n'a pas été révélé

par PCR (résultat non présenté). Le lien entre les activités acidifiante et protéolytique des souches *S. thermophilus* a été mis en exergue dans plusieurs travaux tels que ceux de Galia *et al.* (2009), Dandoy *et al.* (2011) et Urshev *et al.* (2014). Certaines de ces souches ne possèdent pas le gène *prtS*, ce qui représente environ la moitié des génomes séquencés de *S. thermophilus*, tandis que d'autres présentent une différence dans la régulation de l'expression de ce gène (Galia *et al.*, 2009 ; 2016).

Contrairement à *S. thermophilus* LF9 qui est faiblement acidifiant et probablement non protéolytique, le deuxième isolat *S. thermophilus* LA14 est fortement acidifiant, d'ailleurs sa courbe se superpose à celle de la souche de référence *S. thermophilus* LMD-9. Cet isolat possède certainement la protéase active PrtS au même titre que la souche *S. thermophilus* LMD-9. D'ailleurs les deux *S. thermophilus* affichent également le même profil génotypique (ITS type II et profils alléliques MLST identiques).

2.1.2. Acidification du lait par les isolats de *Streptococcus macedonicus*

Concernant *S. macedonicus*, les 18 isolats ont été d'abord testés en lait notamment dans le but d'évaluer leur capacité d'acidification selon laquelle, ils pourraient être distingués (figure 16). Cela nous permettrait de faire un choix quant aux souches à exploiter dans le présent travail.

Les résultats obtenus n'ont pas révélé d'isolats avec une forte activité d'acidification. La quasi-totalité des isolats est considérée comme modérément acidifiante avec une variation de pH en lait d'environ 0,4 unité obtenue entre 3 h et 5 h d'incubation et un pH ultime inférieur à 6 (compris entre 5,0 et 5,3) en 8 h d'incubation. Trois isolats provenant du même produit ont été considérés comme faiblement acidifiants. Il s'agit de *S. macedonicus* LS4, *S. macedonicus* LS1 et *S. macedonicus* LS6. Ces isolats conduisent, au-delà de 5h d'incubation, à des variations de pH en lait de 0,4 avec des valeurs de pH finales supérieures à 6 pour *S. macedonicus* LS4, proche de 6 pour *S. macedonicus* LS1 et inférieure à 6 concernant *S. macedonicus* LS6.

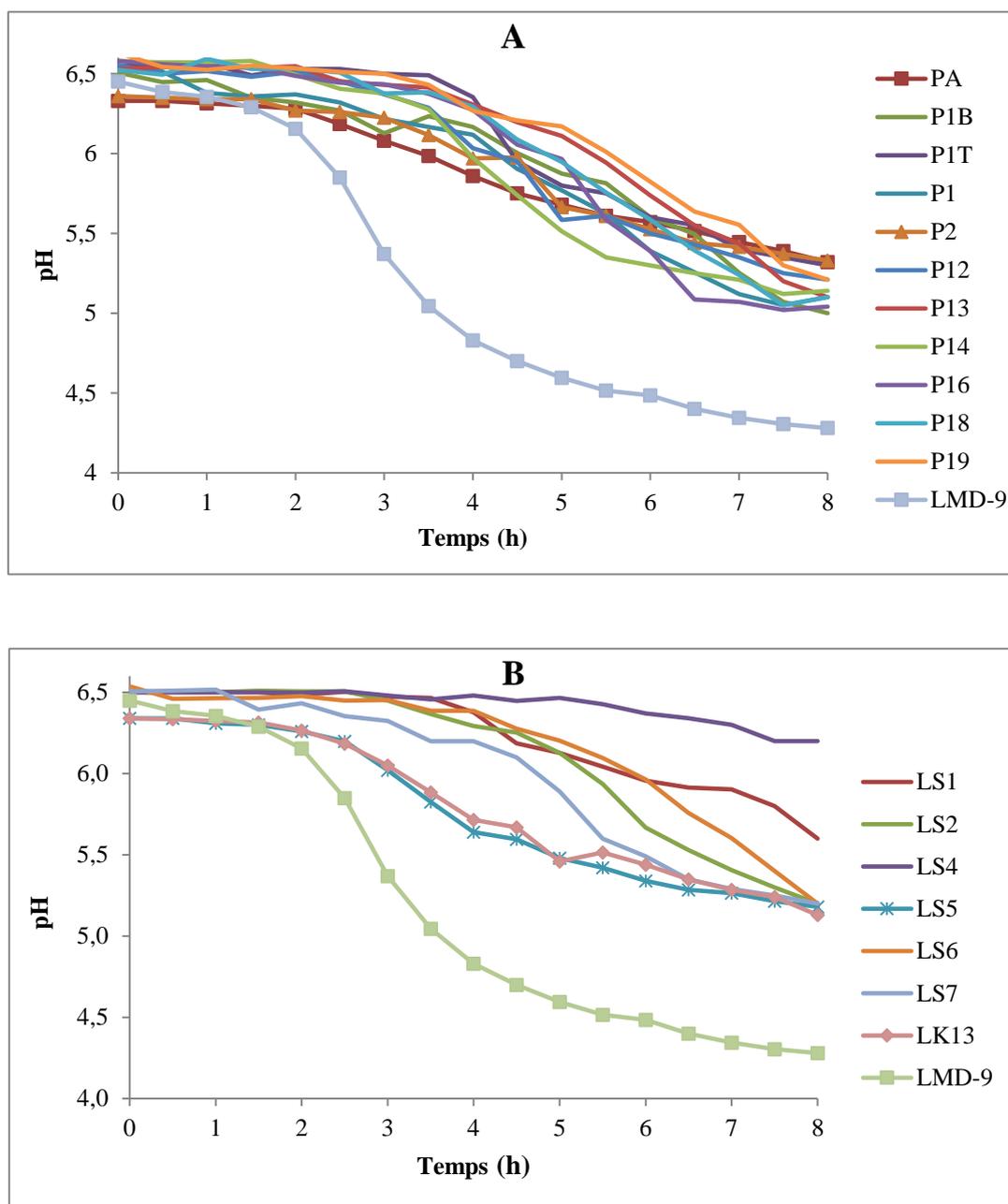


Figure 16. Cinétiques d'acidification en lait des isolats *S. macedonicus* et de la souche *S. thermophilus* LMD-9

A : isolats issues des produits *lben* : LbS et LbK1. B : isolats originaires des produits *rayeb* Rb1FP et Rb2FP. Les moyennes \pm SEM de deux expériences en duplicatas indépendants sont présentées.

Nos résultats concordent avec ce qui a été rapporté dans la littérature concernant cette espèce. Toutes les souches de *S. macedonicus* explorées par Georgalaki *et al.* (2000) étaient modérément acidifiantes. Lombardi *et al.* (2004) et Blaiotta *et al.* (2011) ont détecté des souches avec une activité acidifiante modérée à faible en lait avec des valeurs de pH finales (6 h) en lait comprises entre 5 et 6 et au dessus de 6. Il en est de même pour la souche *S. macedonicus* LC743 qui a été utilisée dans la préparation de fromage *Mozzarella* pour tester *in vivo* sa capacité anti-inflammatoire. Cette souche présente également une capacité acidifiante modérée avec un pH d'environ 5,5 en 6 h d'incubation en lait (Cho *et al.*, 2010 ; 2012). Les souches étudiées par Settani *et al.* (2011) semblent également être moyennement acidifiantes. À ce jour, dans la littérature et au mieux de notre connaissance, une seule souche *S. macedonicus* 33MO isolée par Vendramin *et al.* (2014) est qualifiée de fortement acidifiante, cette souche a atteint le niveau maximum d'acidification du lait en 80 minutes (Tarrah *et al.*, 2018a).

Au regard des résultats relatifs au suivi d'acidification des 18 isolats de *S. macedonicus*, il ne nous a pas été possible de les distinguer clairement. Néanmoins, nous avons, globalement, choisi parmi ceux-ci, les isolats qui semblent afficher relativement les meilleures vitesses d'acidification. Nous avons opté pour un isolat par produit en l'occurrence *S. macedonicus* LS5 et *S. macedonicus* PA qui proviennent, respectivement, des produits LbS et Rb1FP car ils présentent des niveaux d'acidification en lait meilleurs que les isolats partageant avec eux le même produit. Les isolats *S. macedonicus* P2 et *S. macedonicus* LK13 issus de deux produits différents (Rb2FP et LbK1) ont été retenus car ce sont les seuls isolats de *S. macedonicus* représentant ces produits.

2.2. Acidification du lait enrichi en bacto-tryptone *versus* lait

Nous avons utilisé dans cette étude le lait enrichi en bacto-tryptone qui est un hydrolysate de caséines contenant 80% d'oligopeptides et 20% de di, tri-peptides et acides aminés libres. Ce milieu a été utilisé par Galia *et al.* (2009) dans l'étude de la capacité acidifiante des souches de *S. thermophilus*. Il permet également de fournir une indication quant à l'activité protéolytique de surface des isolats. Une lente acidification du lait seul qui est accélérée en présence d'une source de peptides et d'acides aminés libres dénote probablement d'un système protéolytique de surface insuffisant ou inactif. En outre, *S. thermophilus* LMD-9 qui possède une protéase de paroi active (*prtS* +, *PrtS* +) a été utilisée comme témoin positif de l'acidification rapide.

2.2.1. Cas de *Streptococcus thermophilus* LF9

Une accélération de l'acidification a été observée pour notre isolat *S. thermophilus* LF9, le pH a atteint 4,8 en 8 h en rajoutant du bacto-tryptone au lait au lieu de 5,6 en lait seul (figure 15).

Le bacto-tryptone semble avoir amélioré sa vitesse d'acidification du lait enrichi sans pour autant rattraper celle de la souche de référence *S. thermophilus* LMD-9 en lait.

Dans l'étude de Galia *et al.* (2009), les souches *S. thermophilus* faiblement acidifiantes et non protéolytiques cultivées dans le lait enrichi en bacto-tryptone atteignent le même niveau d'acidification que celui des souches fortement acidifiantes en lait. Ce constat laisse à supposer qu'une faible activité protéolytique liée à la PrtS n'est pas le seul facteur impliqué dans la faible capacité acidifiante de notre isolat, les peptidases extracellulaires ont un rôle important dans la croissance de *S. thermophilus* en lait notamment pour les souches ne possédant pas d'activité PrtS (Hafeez *et al.*, 2013).

En outre, compte tenu de la composition du bacto-tryptone (80% oligopeptides et 20% de di- et tri-peptides et acides aminés libres), il se pourrait que des acteurs du système de transport d'oligopeptides, responsables de les internaliser, (Ami) et/ou des peptidases intracellulaires en charge de la dégradation des oligopeptides et d'autres peptides soient faiblement actifs. D'autant plus qu'une peptidase intracellulaire décrite comme telle chez *S. thermophilus* semble aussi, être responsable d'activité peptidasique extracellulaire chez cette espèce (Hafeez *et al.*, 2019).

2.2.2. Cas des isolats de *Streptococcus macedonicus*

Les isolats *S. macedonicus* PA, *S. macedonicus* P2, *S. macedonicus* LS5 et *S. macedonicus* LK13 ont été cultivés en lait enrichi en bacto-tryptone et dont les cinétiques d'acidification en lait avec et sans bacto-tryptone sont présentées pour chacun des isolats dans les figures 17 et 18. La souche *S. thermophilus* LMD-9 y est également exposée comme témoin de l'acidification rapide. Tous ces isolats ont été classés comme modérément acidifiants, toutefois, de petites variabilités apparaissent dans la vitesse d'acidification du lait.

Le lait atteint des valeurs de pH de 5,5 et 5,6 en 6 h d'incubation avec une réduction de pH de 0,4 unité entre 4 et 4,5 h respectivement, pour les isolats *S. macedonicus* PA et *S. macedonicus* P2. Un pH ultime de 5,3 est observé pour les deux isolats au bout de 8h.

Dans le lait supplémenté de bacto-tryptone, le pH est en dessous de 6 à 3 h et 3,5 h, ce qui correspond à une variation de 0,4 unité de pH, avec les isolats *S. macedonicus* PA et *S. macedonicus* P2. Le pH est en dessous de 5 en 5,5 h et atteint la valeur de 4,6 en 8 h d'incubation

(figure 17). Ces deux isolats passent d'une capacité moyenne d'acidification en lait à rapide en lait enrichi en bacto-tryptone.

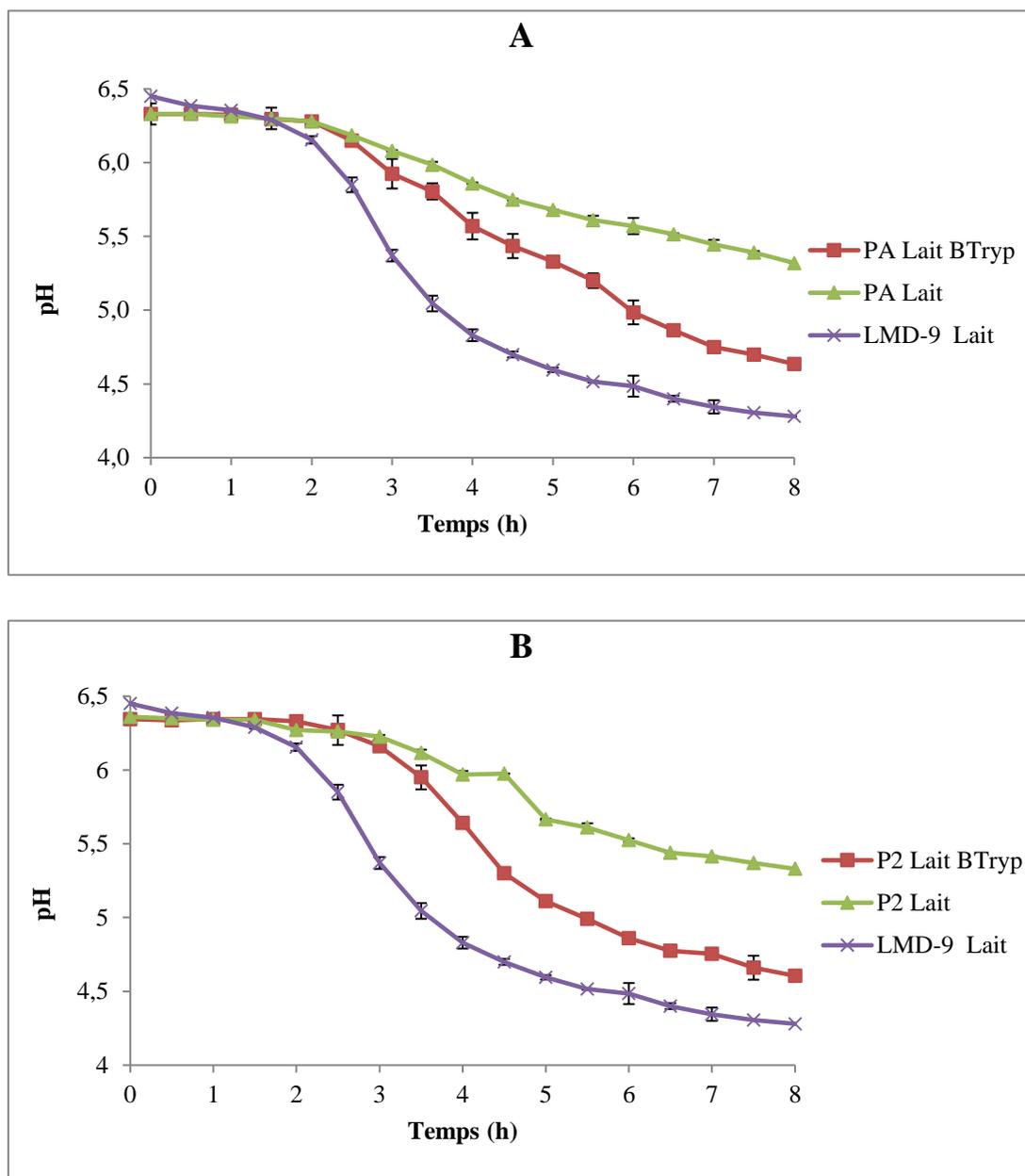


Figure 17. Cinétiques d'acidification en lait avec ou sans bactotryptone des isolats *S. macedonicus* PA (A) et *S. macedonicus* P2 (B) ainsi que la souche *S. thermophilus* LMD-9

Les moyennes \pm SEM de deux expériences en duplicatas indépendants sont présentées.

Pour les isolats *S. macedonicus* LS5 et *S. macedonicus* LK13, leurs vitesses d'acidification du lait sont plus élevées que les isolats précédents. Ces deux isolats réduisent le pH du lait de 0,4 unité en

3,5 h en atteignant une valeur de pH inférieure à 6. Le pH final en lait est maintenu à 5,2 pour *S. macedonicus* LS5 et 5,1 pour *S. macedonicus* LK13.

Ces isolats élèvent davantage la vitesse d'acidification du lait lorsqu'il est supplémenté en bactotryptone avec une variation de pH de 0,4 en 3 h et des valeurs de pH en dessous de 5 en 5 à 5,5 h et de 4,6 au bout de 8 h d'incubation (figure 18).

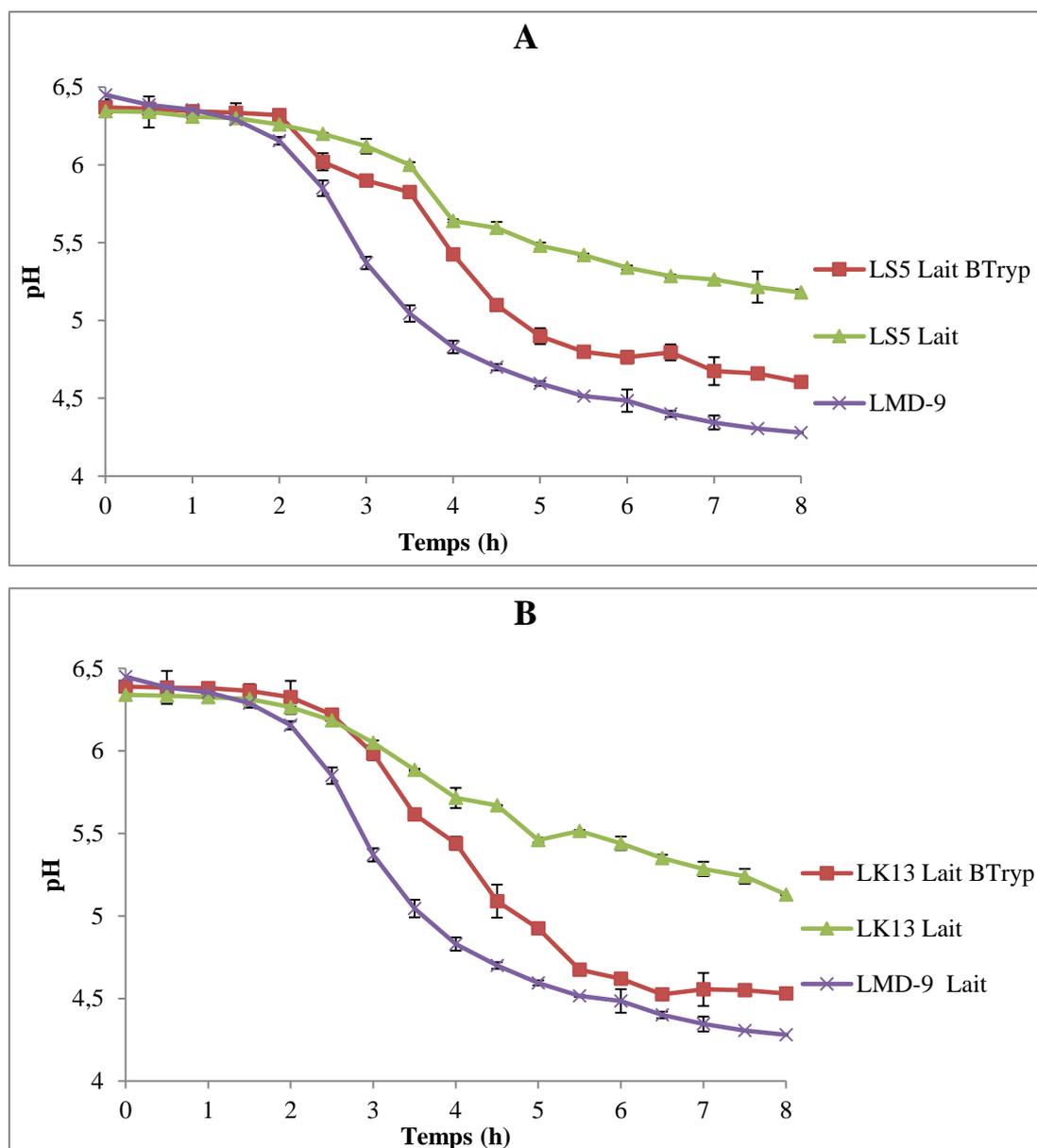


Figure 18. Cinétiques d'acidification en lait avec ou sans bactotryptone des isolats *S. macedonicus* LS5 (A) et *S. macedonicus* LK13 (B) ainsi que la souche *S. thermophilus* LMD-9

Les moyennes \pm SEM de deux expériences en duplicatas indépendants sont présentées.

Ces résultats concordent avec la littérature comme cela a été évoqué plus haut. Les souches *S. macedonicus* étudiées par Georgalaki *et al.* (2000), Lombardi *et al.* (2004) et Blaiotta *et al.* (2011) semblent être modérément acidifiantes et faiblement protéolytiques. En effet, une faible activité protéolytique extracellulaire a été détectée pour quelques souches ce qui confirmerait le lien entre le pouvoir acidifiant et protéolytique de cette espèce. Très peu d'informations existent sur le système protéolytique notamment de surface de *S. macedonicus* qui n'a pas été profondément investigué. En outre une faible activité phospho β -galactosidase a été mise en évidence pour certaines souches de *S. macedonicus* qui pourrait expliquer en partie son faible pouvoir acidifiant (Manachini *et al.*, 2002 ; De Vuyst et Tsakalidou, 2008).

Il faut rappeler que *S. macedonicus* est relativement une nouvelle espèce, comparée à *S. thermophilus*, qui s'adapte de plus en plus au lait. Dès lors, de nouvelles fonctions nécessaires à l'investissement de ce milieu se mettent en place peu à peu. Celles-ci s'acquièrent notamment par transfert horizontal comme cela a été démontré pour plusieurs espèces dont *S. macedonicus*. L'émergence de souches avec un fort potentiel acidifiant et une activité protéolytique extracellulaire est tout à fait possible à l'instar de *S. thermophilus*.

Au terme de l'identification génotypique et de l'étude de la capacité acidifiante de nos isolats en lait, les quatre souches de *S. macedonicus* PA, *S. macedonicus* P2, *S. macedonicus* LS5 et *S. macedonicus* LK13, ainsi que la souche *S. thermophilus* LF9 ont été retenues pour la suite de ce travail. Au vu de la forte proximité génotypique de l'isolat *S. thermophilus* LA14 de la souche de référence *S. thermophilus* LMD-9 et de la superposition des activités acidifiantes des deux entités, la souche *S. thermophilus* LA14 a été écartée.

3. Comportement des souches aux conditions simulées du tractus gastro-intestinal

Dans la suite de ce travail, nous avons étudié les principaux critères que doivent posséder des souches probiotiques. De ce fait, la capacité de nos souches à résister aux conditions du TGI et à adhérer aux cellules épithéliales a été évaluée *in vitro*. Deux souches, *Lb. rhamnosus* GG et *S. thermophilus* LMD-9, ont été utilisées comme références. La souche *Lb. rhamnosus* GG est reconnue comme un probiotique, elle possède une tolérance satisfaisante aux conditions sévères du tube digestif et une bonne capacité d'adhésion. En ce qui concerne la souche *S. thermophilus* LMD-9, elle présente la meilleure capacité de survie aux stress acide et biliaire et d'adhésion aux cellules épithéliales parmi d'autres souches de *S. thermophilus* testées *in vitro* par Junjua *et al.* (2016).

3.1. Survie aux conditions acides

L'une des conditions importantes des probiotiques est leur viabilité dans le TGI, ils doivent alors passer la première barrière acide de l'estomac pour continuer le chemin vers leur cible. A cet effet, nous avons testé *in vitro* la capacité de nos souches à résister au pH acide en les exposant pendant 2 h à des solutions isotoniques acides, ce qui correspond à la moitié du temps de vidange d'un repas semi-solide. Nous avons opté pour des valeurs de pH proches des conditions physiologiques qui varient de 1 à 2 lorsque l'estomac est vide jusqu'à 4 à 5 au cours des repas (Chen *et al.*, 2009 ; Mackie et Rigby, 2015). Ainsi, trois points à savoir pH 2, pH 4 et un point intermédiaire pH 3 ont été fixés. Ces valeurs de pH sont souvent utilisées dans l'étude de la capacité de survie des souches aux conditions acides de l'estomac (Cho *et al.*, 2010 ; Ripamonti, *et al.*, 2011 ; Junjua *et al.*, 2016). L'effet de l'acidité sur la viabilité de ces souches est déterminé par dénombrement sur gélose, la baisse de viabilité d'une souche correspond à la diminution significative de la population bactérienne à un temps donné par rapport à la population initiale.

Après 2 h d'exposition à pH 4, la viabilité de la souche *S. macedonicus* PA n'est pas affectée au même titre que les souches de référence *Lb. rhamnosus* GG et *S. thermophilus* LMD-9. En revanche, les trois autres souches *S. macedonicus* et la souche *S. thermophilus* LF9 subissent une réduction significative de la survie allant de 0,5 à 0,7 log sauf pour la souche *S. macedonicus* LK13 qui perd 1,3 log (figure 19 A).

A pH 3, la souche *S. macedonicus* PA est également plus résistante, avec une diminution de la survie inférieure à 1 log, que les autres *S. macedonicus* et la souche *S. thermophilus* LF9 présentant une réduction de 1,5 à 1,9 log. Les mêmes résultats que ceux affichés par la souche *S. macedonicus* PA ont été obtenus pour *S. thermophilus* LMD-9, alors qu'aucune sensibilité n'a été notée pour la souche *Lb. rhamnosus* GG (figure 19 B).

Après une heure d'exposition à pH 2, toutes les souches *S. macedonicus* ainsi que la souche *S. thermophilus* LF9 n'y ont pas survécu, contrairement à *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG qui ont conservé une certaine viabilité dans ces conditions. Toutefois après 2 h d'exposition à pH 2, ces deux souches sont indétectables (figure 19 C).

Il est à indiquer qu'aucun effet immédiat à (0 h) n'a été observé aux différents pH pour l'ensemble des souches testées.

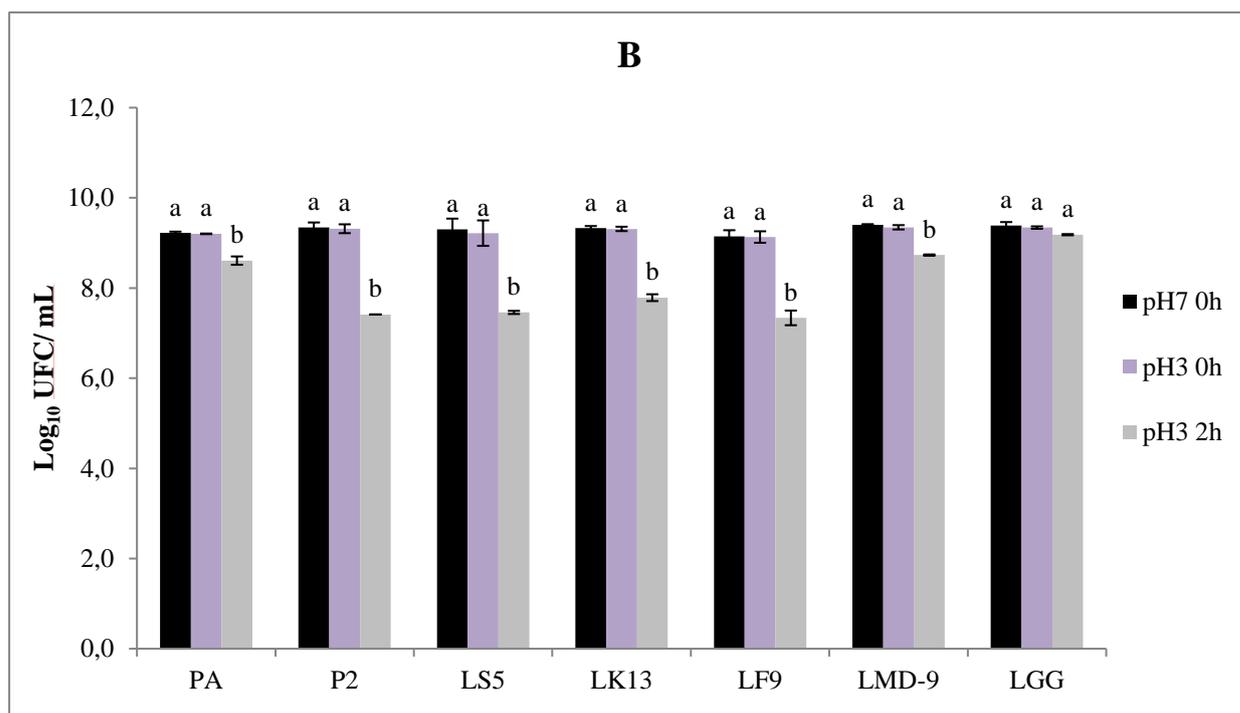
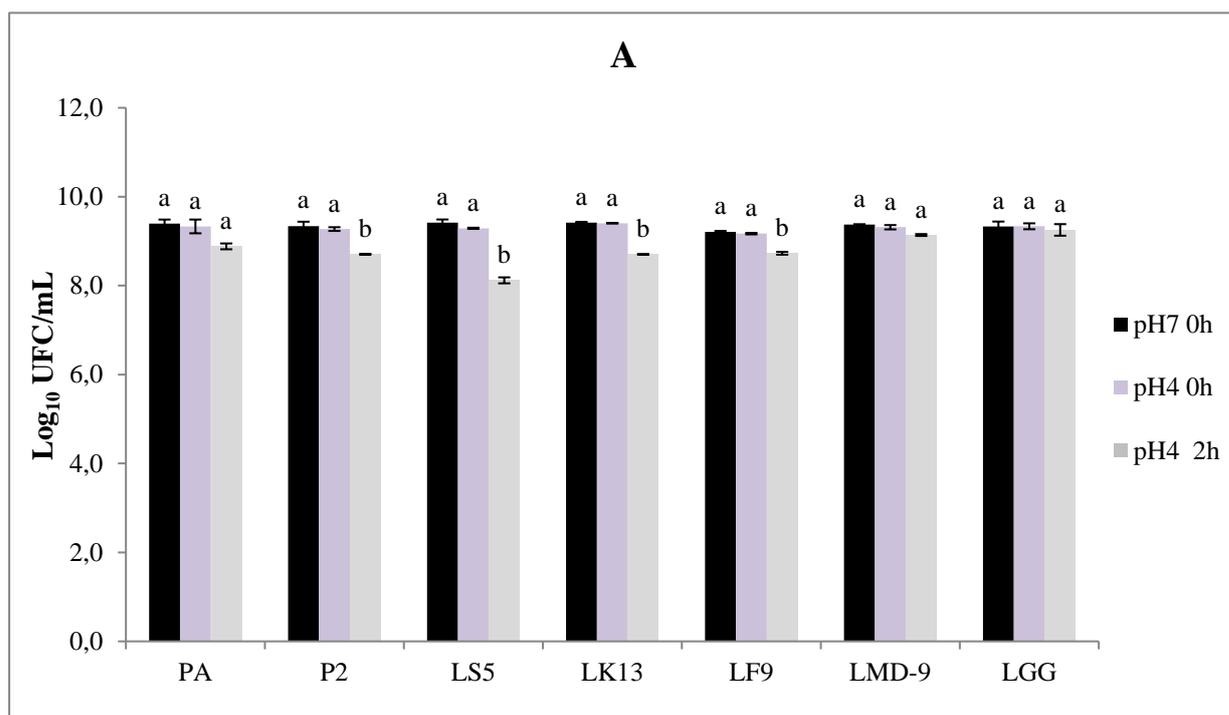


Figure 19. Survie des souches de *S. macedonicus*, *S. thermophilus* LF9, *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG (LGG) après 2 h d'exposition à pH 4 (A), pH 3 (B) et 1 h à pH 2 (C) par rapport au contrôle négatif pH 7

Les résultats sont exprimés en Log₁₀ UFC/mL et les moyennes ± SEM de deux expériences en duplicatas indépendants sont présentées. Les valeurs moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes à $p < 0,05$.

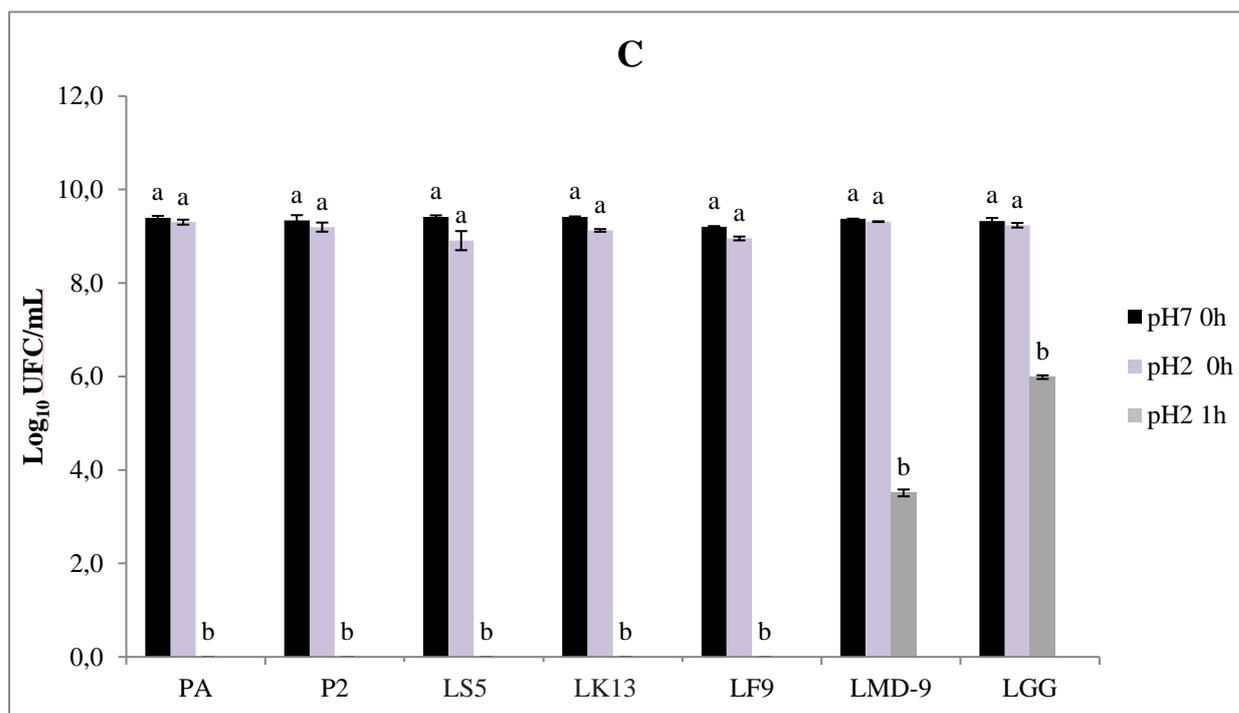


Figure 19. Survie des souches de *S. macedonicus*, *S. thermophilus* LF9, *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG (LGG) après 2 h d'exposition à pH 4 (A), pH 3 (B) et 1 h à pH 2 (C) par rapport au contrôle négatif pH 7 (suite)

Les résultats sont exprimés en Log₁₀ UFC/mL et les moyennes ± SEM de deux expériences en duplicatas indépendants sont présentées. Les valeurs moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes à $p < 0,05$.

Nos résultats indiquent que les quatre souches de *S. macedonicus* ainsi que la souche *S. thermophilus* LF9 résistent à l'acidité jusqu'à pH 3, avec une diminution progressive de la viabilité entre pH 4 et 3 selon les souches.

D'après la littérature, une forte diminution de la viabilité a été observée au bout d'une heure et demi d'exposition à pH 3 pour des souches de *S. macedonicus* SB230 et *S. macedonicus* SB330 d'origine fécale (Rippamoti *et al.*, 2011). Blaiotta *et al.* (2013) ont souligné des taux de survie largement variables à pH 2,5 durant 30 minutes pour dix souches de *S. macedonicus* avec uniquement deux souches dépassant un taux de 60%. La souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 est également, incapable de survivre 1 h à pH 2,5 et une réduction importante de la survie de certaines souches après exposition au même pH pendant 2 h a été indiquée par d'autres auteurs (Zoumpoulou *et al.*, 2008 ; 2018). Pour Tarrah *et al.* (2020), la moitié des souches de *S. macedonicus* étudiées présente une très faible capacité de survie à pH 2,5 alors que l'autre moitié y survit bien. Une baisse

drastique de la survie est constatée pour la souche *S. macedonicus* CRL415 exposée à pH 2 pendant 1,5 h (Laiño *et al.*, 2019). Quant à la souche *S. macedonicus* LC743, elle n'est que faiblement affectée par ce même pH infligé durant 3 h (Cho *et al.*, 2010).

S'agissant de *S. thermophilus*, nos résultats indiquent par ailleurs, que la souche *S. thermophilus* LF9 ne parvient pas à survivre après une heure d'exposition à pH 2 contrairement à la souche de référence *S. thermophilus* LMD-9 qui survit dans les mêmes conditions. Effectivement, cette espèce est souvent considérée comme sensible au stress acide.

Cependant, certaines souches peuvent exprimer des niveaux différents de survie à l'acidité gastrique *in vitro* tel qu'il a été démontré dans certains travaux dont ceux de Junjua *et al.* (2016). Parmi une trentaine de souches de *S. thermophilus* testées, quelques-unes seulement, dont *S. thermophilus* LMD-9, présentaient des taux élevés de survie à l'acidité en parvenant à survivre à pH 2 dans le jus gastrique ainsi que dans le système gastro-intestinal dynamique TIM (Junjua *et al.*, 2016 ; Uriot *et al.*, 2016). Il en est de même dans les travaux de Zotta *et al.* (2008) et Blaiotta *et al.* (2013), où une large variabilité dans la tolérance au stress acide a été constatée pour cette espèce ainsi que pour *S. macedonicus*. Blaiotta *et al.* (2013) ont indiqué des taux de survie à pH 2,5 chez des souches de *S. thermophilus* allant de 4% à 100%. Une perte de viabilité entre 1,6 à 3,8 log a également été rapportée pour 12 souches de *S. thermophilus* exposées à pH 2,4 durant 5h (Ziarno, 2010).

Au bout de 3h d'exposition à pH 2, la souche *S. thermophilus* CECT 801 présente environ 11% de survie (García-Hernández *et al.*, 2012), tandis qu'une perte totale de viabilité a été constatée après 1 h à pH 2 pour des souches de *S. thermophilus* testées par Fang *et al.* (2013). D'autre part, la souche *S. thermophilus* BGVLJ1-44 survit parfaitement bien aux conditions simulées du TGI (Veljović *et al.*, 2017) et les souches *S. thermophilus* RD102 et *S. thermophilus* RD104 affichent une concentration cellulaire de 7,4 log après 2 h à pH 2 sans aucune perte de cellule à pH 4 (Iyer *et al.*, 2010a).

Ces éléments indiquent que la résistance des espèces *S. thermophilus* et *S. macedonicus* aux faibles pH semble être liée à la souche. En effet, cette caractéristique est souvent considérée comme souche voire espèce dépendante et les variabilités sont constatées entre des souches de la même espèce ainsi qu'entre différentes espèces du même genre. Bien que d'une manière générale, les bifidobactéries soient réputées sensibles au stress acide, certaines espèces comme *B. bifidum* et *B. animalis* présentent une bonne résistance à ce stress (Ebel, 2012 ; Sánchez *et al.*, 2013).

Toutefois, malgré leur sensibilité à l'acidité, certaines espèces telles que *S. thermophilus* et *L. lactis* arrivent néanmoins à survivre dans le TGI une fois ingérées sous forme de yaourt et de lait (Klijn *et*

al., 1995 ; Mater *et al.*, 2005). En effet, *S. thermophilus* a été détectée dans les matières fécales de volontaires après consommation de yaourt à des concentrations croissantes durant la période d'ingestion (García-Hernández *et al.*, 2012). Elle a aussi été dénombrée à une charge de 10^8 UFC/g dans les fèces de rats après son administration orale (Thomas *et al.*, 2011 ; Ben-Yahia *et al.*, 2012). Une étude métagénomique a montré la présence d'ADN de *S. thermophilus* dans la matière fécale de plus de 90% d'individus européens étudiés (Qin *et al.*, 2010). Il semblerait également, que des souches ayant montré une faible résistance à l'acidité *in vitro* présentent de bons résultats *in vivo*. Cela est notamment le cas de la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 qui n'a pas survécu une heure à pH 2,5, mais elle a réussi à traverser le TGI, puis qu'elle a été isolée des selles de souris à une concentration proche de la dose administrée oralement (Maragkoudakis *et al.*, 2009).

Par ailleurs, la majorité des travaux visant à évaluer la capacité de survie des souches à l'acidité gastrique sont menés par leur exposition directe à un milieu acide sans pour autant considérer l'effet du véhicule de ces souches à savoir l'aliment. L'intégration des souches probiotiques dans une matrice alimentaire type produits laitiers, céréaliers, etc. peut être envisagée comme une stratégie de protection vis-à-vis des conditions drastiques rencontrés dans le TGI. Le pH de ces aliments, généralement supérieur à 3, ainsi que leur composition et leur structure peuvent exercer des effets tampon et protecteur permettant d'améliorer la viabilité des souches probiotiques dans l'environnement digestif (Iyer *et al.*, 2010a ; Bove *et al.*, 2013).

Sanders et Marco (2009) ont traité dans leur article de synthèse l'impact de la matrice alimentaire sur l'action du probiotique au niveau de l'hôte qui demeure par conséquent viable dans le TGI. Les études évoquées par ces auteurs attestent qu'un effet significatif de la souche *Lb. rhamnosus* GG dans le traitement de l'arthrite est perçu lors qu'elle est apportée par le yaourt. Pitino *et al.* (2012) ont étudié l'effet d'une matrice de fromage sur la survie des souches de *Lb. rhamnosus* *in vitro* dans un modèle gastro-intestinal dynamique et ils ont observé une forte capacité de survie des souches véhiculées dans le fromage. Bove *et al.* (2013) ont également observé un taux de survie élevé à l'acidité gastrique *in vitro* de la souche *Lb. plantarum* WCFS1 lorsque celle-ci est utilisée dans une matrice riche en nutriments ou contenant des prébiotiques. L'effet des extraits de châtaigne sur la viabilité des souches de *Lactobacillus* (*Lb. rhamnosus*, *Lb. casei*) et de *Streptococcus* (*S. thermophilus*, *S. macedonicus*) a été étudié par Blaiotta *et al.* (2013). Ces extraits ont grandement amélioré la tolérance des lactobacilles au jus gastrique et intestinal simulés.

En outre, une augmentation significative de la survie de la souche *S. thermophilus* LMD-9 dans les compartiments du tube digestif simulé par le modèle dynamique TIM est observée pour la souche intégrée dans une formule de lait fermenté par rapport à celle inoculée dans le lait (Uriot *et al.*,

2016). De la même manière, Mantovani *et al.* (2019) ont indiqué que l'incorporation d'une souche de *Lb. casei* dans le flan au chocolat a permis d'augmenter la résistance de la souche aux conditions simulées du TGI.

Il est à noter, que des mécanismes de lutte et de protection contre le stress acide ont été mis en évidence chez *S. thermophilus* et *S. macedonicus* tels que l'augmentation du niveau d'expression du complexe F₀F₁-ATPase, l'accroissement de l'expression des protéines chaperonnes sHps, GroEL and GroES et de l'activité uréasique, etc. (voir chapitre 3 section 3.1.2.1). Ils peuvent être induits chez les bactéries par une exposition à un stress acide non létal (sub-létal) à travers une réponse ATR (*Acid Tolerance Response*) leur permettant de résister et de s'adapter à un stress plus létal et prolongé dans le temps. Cela confère à beaucoup d'entre elles une extraordinaire capacité de tolérance des conditions hostiles (De Angelis *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 2014b ; Liu *et al.*, 2016).

Généralement, les souches recueillies au cours de la phase stationnaire de croissance résistent mieux à l'acidité car les mécanismes de l'ATR peuvent être déclenchés sous l'effet du stress perçu par leur propre production d'acides organiques (Ebel, 2012). L'exposition préalable des souches de *S. macedonicus* à un stress acide modéré non létal a induit une réponse ATR, principalement à travers l'augmentation des activités F₀F₁-ATPase et enzymatique (glucose spécifique phosphoénolpyruvate et système phosphotransférase : glucose-PEP-PTS) ainsi que des changements majeurs dans la composition cellulaire, permettant d'améliorer l'adaptabilité de ces souches à un niveau de stress plus élevé (Papadimitriou *et al.*, 2006 ; 2007 ; 2008). La pré-exposition des souches de *Lb. casei* et *Le. mesenteroides* à pH 4,5 et 5 a entraîné une augmentation de leur survie à des pH plus bas (Kim *et al.*, 2014 ; Wu *et al.*, 2014a).

De même, une augmentation conséquente du taux de survie de *L. lactis* à pH 3,9 a été enregistrée suite à son adaptation à pH 5,5 (Hartke *et al.*, 1996). De plus, il a été suggéré que l'adaptation efficace à un stress donné notamment acide entraîne une acquisition de tolérance vis-à-vis d'autres stress. C'est ainsi qu'une adaptation au stress acide a entraîné chez les bifidobactéries une tolérance à la bile, à la salinité et au stress oxydant chez *L. lactis* (Sánchez *et al.*, 2013 ; Wu *et al.*, 2017). Aussi, L'exposition aux basses températures (10°C pendant 2 h) a considérablement amélioré la survie d'une souche de *S. thermophilus* à pH 2,5 et 2,8 du jus gastrique et intestinal simulés par rapport aux souches non traitées (Fang *et al.*, 2013). Pareillement pour des souches de *Lb. plantarum* dont la pré-exposition à un traitement thermique sub-létal a augmenté la croissance de la souche à pH bas (De Angelis *et al.* 2004). De ce fait, l'induction de l'ATR *in vitro* et l'adaptation à différents types de stress constitueraient une alternative prometteuse pour concevoir des souches plus robustes.

3.2. Survie aux sels biliaires

La bile est considérée comme l'un des stress majeurs rencontré par les probiotiques dans le tube digestif qu'ils doivent surmonter pour pouvoir exercer leur effet bénéfique sur l'hôte. La toxicité des sels biliaires qui en sont les principaux constituants est telle que les effets des enzymes pancréatiques, qui sont dans l'environnement intestinal, sont bien négligeables sur la viabilité des BL *in vitro* en absence de SB (Ruiz-Moyano *et al.*, 2008 ; Ranadheera *et al.*, 2012). La concentration physiologique de ces derniers varie selon la nature de l'alimentation, le type de SB et le compartiment du tube digestif (Kebouchi *et al.*, 2016). Les concentrations physiologiques en SB varient de plus de 40 mM à moins de 1 mM (Islam *et al.*, 2011; Ruiz, 2013) avec une concentration de 10 mM dans l'intestin grêle (Bajor *et al.*, 2010).

La majorité des travaux sur la survie aux SB utilise l'extrait de bile bovine ou porcine dont la composition exacte n'est pas bien connue. Nous avons préféré utiliser un mélange équimolaire de SB (MSB) avec des niveaux de toxicité différents, selon le protocole de Kebouchi *et al.* (2016). Ce mélange contient deux SB libres primaires le cholate et secondaire le désoxycholate ainsi qu'un SB conjugué qui est le taurocholate. L'effet du MSB sur la survie de nos souches a été déterminé aux concentrations de 4 mM, 5 mM, 6 mM et 10 mM durant 2 h. La survie des souches à ces conditions a été évaluée par leur dénombrement sur gélose.

Les résultats obtenus n'indiquent aucun effet significatif après 2 h d'exposition à 4 mM de MSB pour les souches *S. macedonicus* LS5 et *S. macedonicus* LK13, alors qu'une réduction d'environ un log a été soulignée pour les souches *S. macedonicus* PA et *S. macedonicus* P2 et 1,8 log pour la souche *S. thermophilus* LF9. Quant à la souche *S. thermophilus* LMD-9, elle n'est pas détectable à cette concentration et une perte de 3,7 log est enregistrée pour *Lb. rhamnosus* GG (figure 20 A). A la concentration de 5 mM de MSB, une relative réduction de viabilité est observée pour toutes les souches à l'exception de la souche *S. macedonicus* LK13 qui demeure intacte (figure 20 B).

A partir de la concentration de 6 mM de MSB, l'ensemble des souches de *S. macedonicus* subissent une baisse significative de la survie allant de 1 log pour les souches *S. macedonicus* LS5 et *S. macedonicus* LK13 à 2,5 log pour la souche *S. macedonicus* PA et 4,6 log pour la souche la plus sensible *S. macedonicus* P2. La survie de la souche *S. thermophilus* LF9 est réduite de 3,6 log et celle de *Lb. rhamnosus* GG de 6,5 log (figure 20 C). Mis à part la souche *S. macedonicus* P2, les trois autres souches ainsi que la souche *S. thermophilus* LF9 ont survécu à 10 mM de MSB. Plus de la moitié de la population initiale des souches *S. macedonicus* LS5 et *S. macedonicus* LK13 et environ la moitié de celle des souches *S. macedonicus* PA et *S. thermophilus* LF9 ont conservé leur

viabilité, tandis que la souche de référence *Lb. rhamnosus* GG n'est plus détectable à cette concentration (figure 20 D).

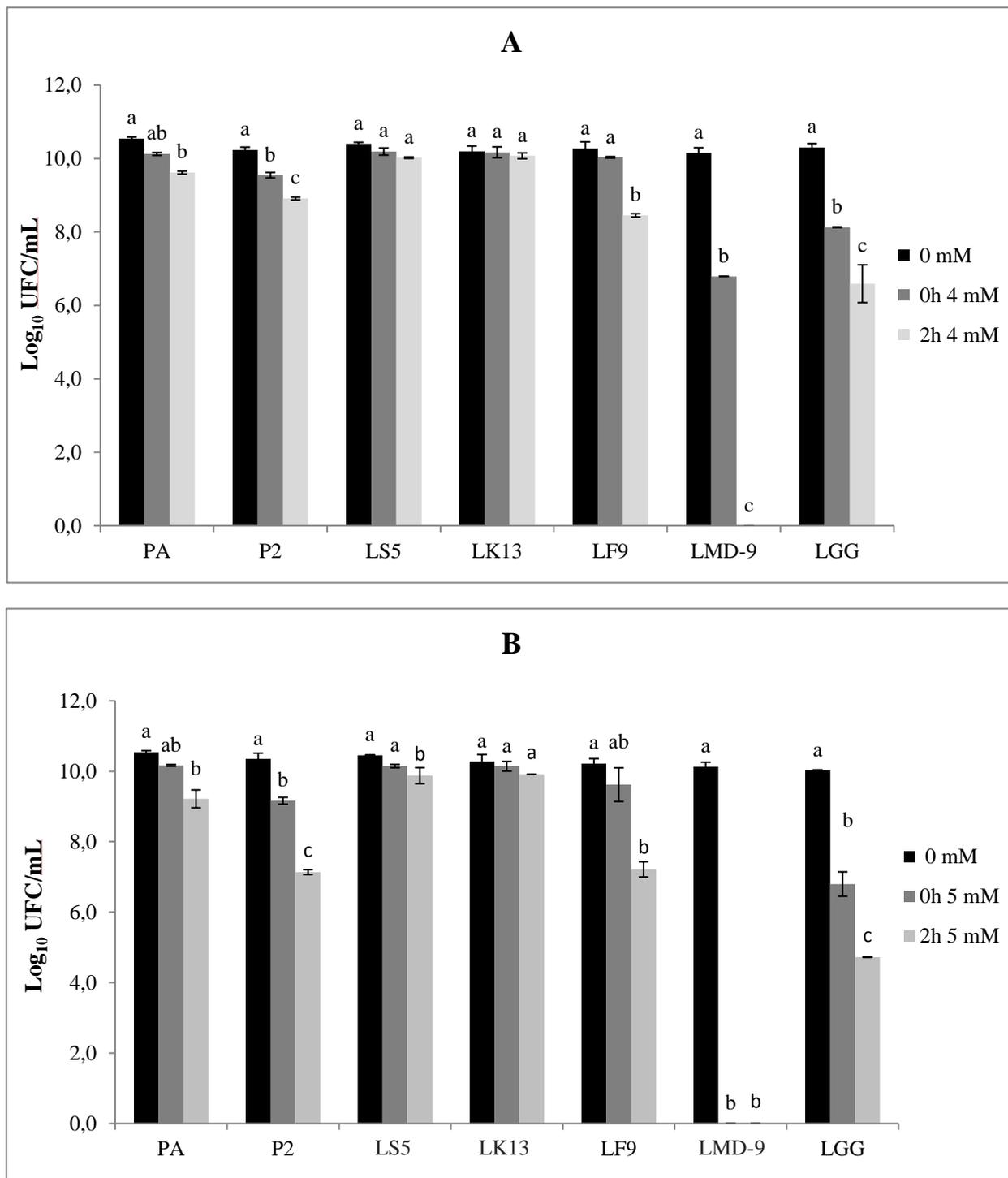


Figure 20. Survie des souches de *S. macedonicus*, *S. thermophilus* LF9, *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG (LGG) après 2 h d'exposition au MSB aux concentrations de 4 mM (A), 5 mM (B), 6 mM (C) et 10 mM (D) comparée au contrôle négatif 0 mM

Les résultats sont exprimés en Log_{10} UFC/mL et les moyennes \pm SEM de deux expériences en duplicatas indépendants sont présentées. Les valeurs moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes à $p < 0,05$.

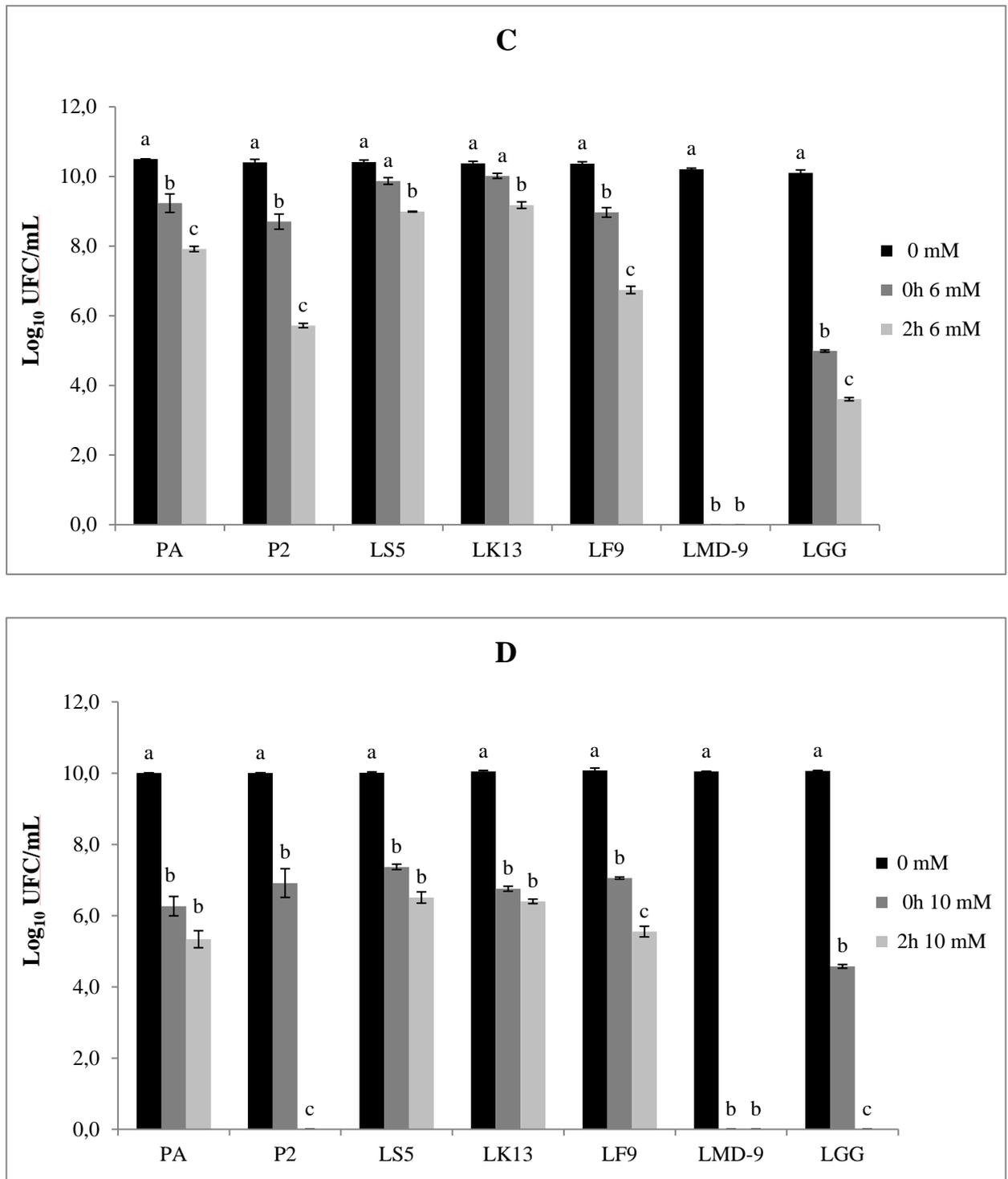


Figure 20. Survie des souches de *S. macedonicus*, *S. thermophilus* LF9, *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG (LGG) après 2 h d'exposition au MSB aux concentrations de 4 mM (A), 5 mM (B), 6 mM (C) et 10 mM (D) comparée au contrôle négatif 0 mM (suite)

Les résultats sont exprimés en Log_{10} UFC/mL et les moyennes \pm SEM de deux expériences en duplicatas indépendants sont présentées. Les valeurs moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes à $p < 0,05$.

Par ailleurs, un effet choc (à 0 h) significatif a été observé pour la souche *S. macedonicus* P2, *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG à 4 mM de MSB, à partir de 6 mM pour la souche *S. macedonicus* PA ainsi que la souche *S. thermophilus* LF9 et à 10 mM pour les deux autres souches.

Ces résultats montrent que nos souches, à l'exception de *S. macedonicus* P2, résistent assez bien à des concentrations élevées en SB. D'ailleurs, le niveau de survie est nettement supérieur aux souches de référence *Lb. rhamnosus* GG et *S. thermophilus* LMD-9. Cette dernière est d'ailleurs, en dessous du niveau de détection contrairement à notre souche *S. thermophilus* LF9 qui survit à toutes les concentrations de MSB testées.

A l'instar de la survie à l'acidité, la capacité de résistance des deux espèces aux SB semble être souche dépendante au vu des différentes études rapportées dans la littérature. Pour *S. macedonicus*, certaines souches expriment une excellente tendance à la résistance à des concentrations élevées en SB. Cela est le cas notamment de la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 qui survit totalement à 1 et 2% de bile oxgall pendant 4 h (Zoumpopoulou *et al.*, 2008) et des souches *S. macedonicus* LC743, *S. macedonicus* SB230 et *S. macedonicus* SB330 pour qui, une légère réduction de viabilité (moins d'un log) est indiquée après 3 h d'exposition à 0,3% de bile oxgall (Cho *et al.*, 2010 ; Ripamonti *et al.*, 2011). Les quatre souches de *S. macedonicus* étudiées par Tarrah *et al.* (2020) affichent également une bonne résistance suite à une exposition de 3 et 5 h au jus intestinal simulé.

En revanche, une grande variabilité est soulignée dans la capacité de survie à la même concentration pour dix souches de *S. macedonicus* dont le taux de survie va de 1 à 100% et il est moins de 46% pour 80% d'entre elles (Blaiotta *et al.*, 2013). Parmi les souches étudiées par Zoumpopoulou *et al.* (2018), seule une souche *S. macedonicus* ACA-DC 208 exprime un bon niveau de survie après 3 h à 1% de SB en perdant moins de 1,5 log alors que la capacité de croissance de la souche *S. macedonicus* CRL415 testée par Laiño *et al.* (2019) en présence de 1% et de 0,3% de SB est respectivement, en dessous de 30% et 60%.

En ce qui concerne l'espèce *S. thermophilus*, certaines études soulignent sa résistance aux SB tel que c'est le cas pour la souche *S. thermophilus* 14085, qui n'est pas affectée par une exposition à 2% de SB durant 12 h (fang *et al.*, 2013). Pareil pour les souches *S. thermophilus* RD102 et *S. thermophilus* RD104 exposées 3 h à 1 et 2% de bile (Iyer *et al.*, 2010a). Une perte de viabilité d'environ 0,5 et 1,5 log est indiquée pour *S. thermophilus* TA040 suite à son exposition à 3 et 4 g/L de SB pendant 12 h (Ziar *et al.*, 2014). Une faible réduction de survie est également soulignée pour

la souche *S. thermophilus* BGVLJ1-44 incubée 2h dans le jus duodéal simulé à 0,3% de bile (Veljović *et al.*, 2017).

Toutefois, la sensibilité de *S. thermophilus* aux SB a été perçue pour plusieurs souches comme celles testées par Ziarno (2010), qui ont perdu entre 2,6 et 3,8 log au contact du fluide duodéal simulé à 1,7 g/L de bile pendant 6 h. Concernant *S. thermophilus* LMD-9, Kebouchi *et al.* (2016) ont rapporté que cette souche survit jusqu'à 3 mM de MSB, avec une baisse significative de sa viabilité, au-dessus de cette concentration aucune cellule n'est détectable. Junjua *et al.* (2016) ont également observé une résistance modérée à 0,5 g/L de cholate et désoxycholate de sodium, pour les 30 souches de *S. thermophilus* testées avec une diversité dans le niveau de survie. Dans le système dynamique TIM, la survie de *S. thermophilus* est aussi souche dépendante puisque la souche *S. thermophilus* CNRZ21 n'est plus détectable dans le compartiment du duodénum après 4 h de digestion alors que les souches *S. thermophilus* LMD-9, *S. thermophilus* PB18O et *S. thermophilus* EBLST20 atteignent les compartiments jéjunal et iléal du système TIM avec une réduction de la concentration cellulaire au bout de 5 h de digestion (Uriot *et al.*, 2016).

Ces données suggèrent que la capacité de survie des deux espèces aux SB dépend de la souche, des conditions d'expérimentation et des SB utilisés (Kebouchi *et al.*, 2016). Il est à l'évidence, difficile de mimer exactement l'environnement intestinal *in vitro*. Rien que la concentration en SB varie à l'entrée de l'intestin grêle en fonction de la nature du repas et de son séjour, elle est maximale à l'arrivée du repas et elle a tendance à diminuer complètement au bout de 2 h. En outre, l'absence de standardisation des protocoles d'expérimentation rend bien difficile les comparaisons entre les différentes études.

Il est à noter par ailleurs, que la forte toxicité reconnue des SB sur les bactéries notamment l'effet détergent sur les membranes a engendré un effet significatif sur la survie de nos souches dès le contact immédiat (0 h) notamment à 10 mM de MSB. D'ailleurs la toxicité des SB est supérieure à celle du HCl au regard des résultats obtenus dans le test de survie au stress acide où aucun effet immédiat n'a été perçu même au pH délétère (pH 2) sur nos souches. Autant cet acide ne diffuse pas facilement à travers la membrane, les SB, notamment non conjugués, s'attaquent directement à celle-ci. La survie des différentes souches est ensuite maintenue pendant 2 h après exposition au MSB en limitant les effets toxiques des SB par la mise en place de stratégies a priori efficaces de protection. Peu de travaux ont étudié les mécanismes de lutte contre les SB pour l'espèce *S. thermophilus* et aucune étude, à notre connaissance, n'existe concernant *S. macedonicus*.

En effet, Uriot *et al.* (2016) ont suggéré que la sensibilité de la souche *S. thermophilus* CNRZ21 dans le système TIM serait attribuée au fait qu'elle ne dispose pas dans son génome de certaines protéines de choc thermique impliquées dans la réponse au stress digestif. De plus, cette souche ne possède pas d'activité uréasique, contrairement aux autres souches testées par ces auteurs dont *S. thermophilus* LMD-9, et qui pourrait contrer l'acidification du cytoplasme par l'accumulation intracellulaire d'acides HCl et pourquoi pas biliaires.

En outre, d'après Kebouchi *et al.* (2016), l'inactivation des gènes codant les protéines de surface PrtS et MucBP, a affecté la survie de *S. thermophilus* LMD-9 au MSB. Or, dans notre étude, la souche *S. thermophilus* LF9 affiche un bon niveau de survie au MSB qui est bien supérieur à celui de *S. thermophilus* LMD-9, alors qu'elle ne semble pas posséder d'activité PrtS vu sa faible capacité d'acidification du lait. Il apparaît que les mécanismes de réponse au stress digestif et en l'occurrence biliaire soient multiple et également souche dépendante chez les bactéries.

Par ailleurs, parmi les protéines membranaires, existent les pompes à efflux qui sont impliquées dans l'extrusion active d'une large gamme de substrats toxiques pour la cellule. Le gène *tetA-like* codant les protéines TetA appartenant à la superfamille des facilitateurs majeurs (MFS) de transport a été identifié dans le génome de quelques souches de *S. thermophilus* dont *S. thermophilus* LMD-9 et de la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 (Arioli *et al.*, 2014). Ces auteurs ont démontré que la surexpression de ce gène dans les souches de *S. thermophilus* a entraîné une réduction de la sensibilité au bromure d'éthidium, à la tétracycline et à d'autres composés toxiques, même lorsque la pompe à efflux était surexprimée dans une souche dépourvue naturellement du gène de type *tetA*. Les composés toxiques contre lesquels ces protéines seraient efficaces pourraient être les SB, participant ainsi à la détoxification des cellules de *S. thermophilus* et pourquoi pas de *S. macedonicus*. Tarrah *et al.* (2020) ont également observé *in silico* dans les génomes des souches de *S. macedonicus* présentant les meilleures capacités de survie au jus gastro-intestinal, un nombre important de gènes liés aux fonctions de réponse au stress notamment des gènes de l'opéron *opuCABCD* qui sont impliqués dans la réponse au stress osmotique.

D'autre part, les EPS produits par de nombreuses BL dont l'espèce *S. thermophilus*, forment une couche de molécule à la surface des bactéries les protégeant ainsi des substances toxiques en l'occurrence les SB (Broadbent *et al.*, 2003). En effet, la souche *S. thermophilus* BGVLJ1-44 qui présente une bonne résistance aux SB est capable de produire des EPS. La couche d'EPS est supposée être un des moyens de lutte de cette souche contre les conditions hostiles de l'environnement (Veljović *et al.*, 2017). De la même manière, Boke *et al.* (2010) ont démontré la corrélation positive entre la survie aux SB et la production d'EPS tout en précisant que les souches

de *S. thermophilus* fortement productrices d'EPS montraient un effet protecteur significatif contre les SB. L'exposition à 0,3% de bile pendant 2 h a engendré 45% de survie pour les souches fortement productrices contre moins de 7% pour les souches les moins productrices. En ce qui concerne *S. macedonicus*, peu de souches expriment une activité EPS et de ce fait leur implication la lutte contre le stress biliaire serait probablement négligeable.

Bien que l'activité BSH ne soit pas courante chez les BL, des travaux ont tout de même souligné le lien entre cette activité et la survie des souches de *S. thermophilus* aux SB. Iyer *et al.* (2010a) indiquent que les souches *S. thermophilus* RD102 et *S. thermophilus* RD104 caractérisées par leur résistance aux SB expriment une bonne activité BSH au même titre que la souche étudiée par Ziar *et al.* (2014). L'implication de cette activité dans la détoxification des SB et l'amélioration de la résistance des souches n'est pas toujours nécessaire pour certaines souches. Cela est le cas de la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198, qui est pourvue d'une grande résistance aux SB alors qu'il a été démontré *in silico* la présence de pseudogène *bsh* dans son génome (Zoumpopoulou *et al.*, 2008 ; Papadimitriou *et al.*, 2014). Ce qui suggère par ailleurs, que l'activité BSH n'est pas une stratégie employée par cette souche voire d'autres souches de cette espèce dans la lutte contre le stress biliaire, d'autres mécanismes en sont empruntés et qui méritent d'être élucidés pour cette espèce. D'un autre côté, ces éléments indiquent également que l'activité BSH dépend aussi de la souche.

Il est à rappeler que la majorité des probiotiques sont consommés dans les produits alimentaires censés protéger les souches concernées durant le transit digestif de par leurs ingrédients et structures. Ainsi l'importance de la matrice alimentaire sur la viabilité de ces souches a été révélée par plusieurs travaux et évoquée dans la section précédente (3.1. Survie aux conditions acides). Certains travaux ont d'ailleurs mis en exergue l'impact de la source de carbone dans l'amélioration de la survie à la bile. Pour exemple, Ziar *et al.* (2014) ont montré que l'ajout du lactose au milieu, a contribué à améliorer considérablement la résistance d'une souche de *S. thermophilus* à la bile par rapport au glucose, qui inversement affectait sa survie. De la même manière, le lactulose et la pectine ont permis d'augmenter la résistance à la bile d'une souche de *Lb. rhamnosus*. D'autres travaux ont également mis en avant l'effet des lipides sur la protection des contre les effets des SB *in vitro* par leur intégration dans une crème glacée chocolatée (Ranadheera *et al.*, 2012).

3.3. Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales *in vitro*

L'adhésion des bactéries à l'épithélium intestinal (aux cellules épithéliales et/ou au mucus) est un critère important au potentiel probiotique. Une meilleure adhésion des bactéries, combien

même transitoire, pourrait améliorer leur persistance et favoriser un dialogue intime avec les cellules épithéliales (Fernandez *et al.*, 2018). Le mucus recouvrant le tube digestif constitue le premier point de contact des bactéries en transit avec les constituants de l'épithélium. L'adhésion au mucus est la première étape d'interaction du probiotique avec les cellules hôtes pouvant alors induire une réponse positive et favoriser la colonisation au niveau intestinal. De ce fait, l'étude de la capacité d'adhésion *in vitro* des quatre souches de *S. macedonicus*, des souches *S. thermophilus* LF9, *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG, aux cellules épithéliales intestinales a été réalisée sur les modèles cellulaires avec ou sans sécrétion de mucus, à savoir Caco-2 TC7, HT29-MTX et HT29-CL16E.

Caco-2 sont des lignées cellulaires d'adénocarcinome colique humain capables de se différencier spontanément *in vitro* en monocouche cellulaire exprimant des protéines apicales et basolatérales comme les entérocytes de l'intestin grêle humain, tandis que les cellules HT29 se différencient en cellules caliciformes polarisées et sécrètent des quantités massives de mucus composé principalement de mucines MUC5AC d'origine gastrique pour les cellules HT29-MTX et de MUC2, d'origine intestinale, pour les cellules HT29-CL16E (Pinto *et al.*, 1983 ; Lesuffler, *et al.*, 1990 ; Kebouchi *et al.*, 2016).

Ces modèles permettraient de se rapprocher au mieux des conditions réelles des cellules intestinales humaines pour l'évaluation de l'adhésion des souches aux cellules épithéliales et au mucus tapissant le tube digestif. Les trois modèles expriment différentes propriétés de surface rencontrées dans l'environnement intestinal rendant pertinente leur utilisation dans le cadre de notre étude.

Il est à souligner que les cellules Caco-2 et HT29 constituent les principales lignées utilisées dans l'étude de l'adhésion bactérienne. Le clone TC7 confère par ailleurs, aux cellules Caco-2 un haut degré de différenciation et permet d'améliorer la performance et la stabilité du modèle cellulaire (Zucco *et al.*, 2005 ; Kamiloglu *et al.*, 2015 ; Jose *et al.*, 2017). Ce qui justifie son emploi dans cette étude. Les lignées dérivées des cellules parentales HT29 semblent être de plus en plus utilisées dans l'étude de l'adhésion bactérienne notamment les HT29-MTX (Coconnier *et al.*, 1992 ; Van Tassell *et al.*, 2011 ; Kamiloglu *et al.*, 2015) contrairement aux lignées HT29-CL16E. Kebouchi *et al.* (2016) sont les premiers, à notre connaissance, à les avoir adoptées pour l'étude de l'adhésion bactérienne des BL au mucus de type intestinal.

3.3.1. Choix du support cellulaire pour l'étude de l'adhésion

Nous avons constaté dans la littérature, que les puits comme les inserts sont employés comme supports de culture cellulaire pour l'évaluation de l'adhésion bactérienne. Toutefois, les inserts peuvent être plutôt pertinents pour l'étude des échanges à travers les cellules (Slater *et al.*, 2011 ; García-Cayuela *et al.*, 2014 ; Altamim *et al.*, 2016).

Ce dispositif est en fait une membrane perméable en polycarbonate de porosité 0,4 μm sur laquelle les cellules peuvent croître. Elle est fixée à un insert de 4,2 cm^2 dont l'extrémité inférieure est en contact avec le puits d'une microplaque, contenant le milieu nutritif (Figure 21).

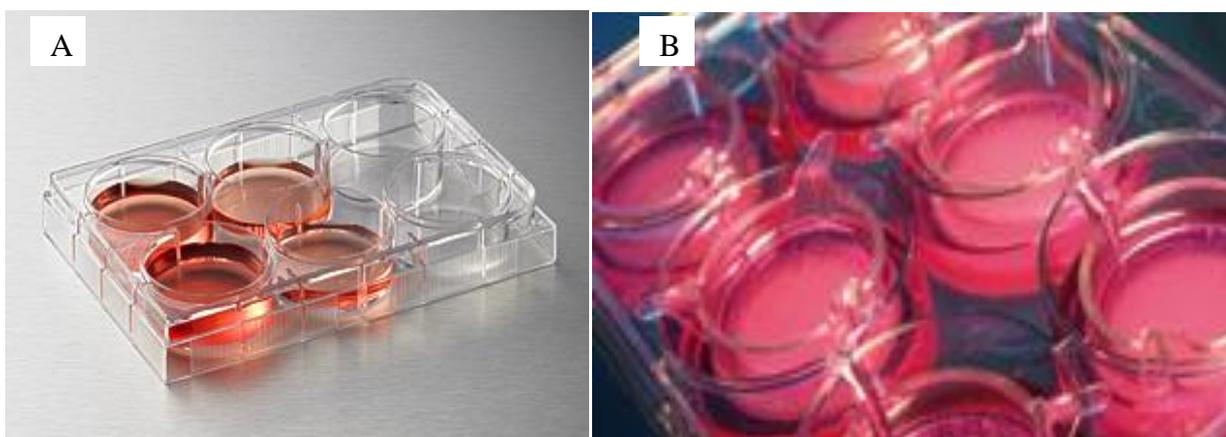


Figure 21. Microplaque pour culture cellulaire

Puits (A) et inserts (B)

Pour asseoir notre choix de support, nous avons décidé de mener une expérience d'adhésion des souches *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG aux cellules Caco2-TC7 et HT29-MTX cultivées en inserts et en puits. Les résultats obtenus présentés dans les figures 22 et 23 n'indiquent aucune différence significative ($p < 0,05$) pour *S. thermophilus* LMD-9 en puits par rapport aux inserts pour les deux modèles cellulaires utilisés, de même pour *Lb. rhamnosus* GG en puits / insert dans le modèle HT29-MTX. La seule différence est notée pour *Lb. rhamnosus* GG en Caco2-TC7. Ces résultats nous ont servi à valider les puits comme support de culture cellulaire pour notre étude, ce qui a permis de réduire le coût des expérimentations.

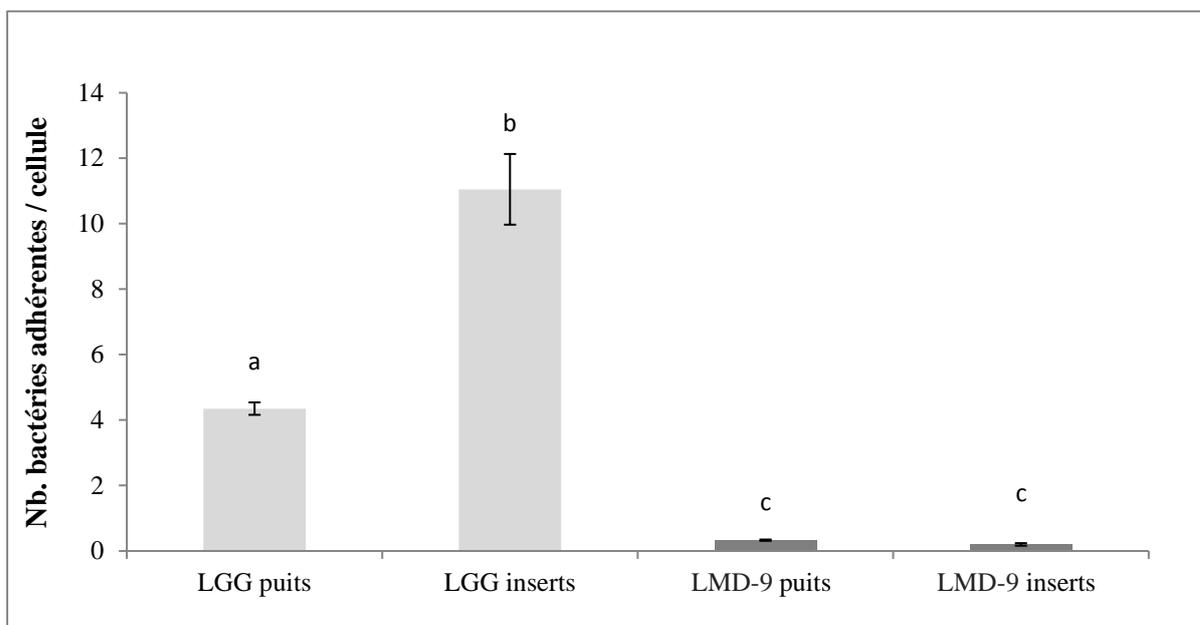


Figure 22. Adhésion *in vitro* des souches *Lb. rhamnosus* GG (LGG) et *S. thermophilus* LMD-9 en puits *versus* inserts aux cellules épithéliales Caco-2 TC7

Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries adhérentes (UFC/mL) par cellule eucaryote (11×10^6 cellules eucaryotes/puits) et les moyennes \pm SEM de deux expériences en duplicatas indépendants sont présentées. Les valeurs moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes à $p < 0,05$.

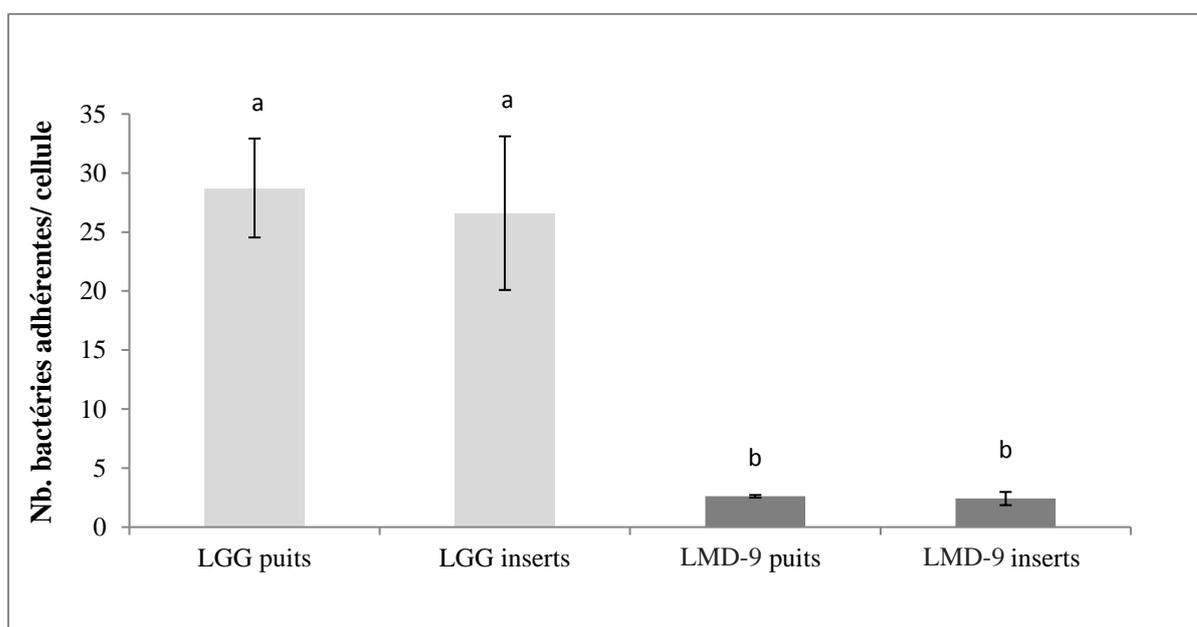


Figure 23. Adhésion *in vitro* des souches *Lb. rhamnosus* GG (LGG) et *S. thermophilus* LMD-9 en puits *versus* inserts aux cellules épithéliales HT-29 MTX

Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries adhérentes (UFC/mL) par cellule eucaryote (11×10^6 cellules eucaryotes/puits) et les moyennes \pm SEM de deux expériences en duplicatas indépendants sont présentées. Les valeurs moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes à $p < 0,05$.

3.3.1. Adhésion des souches aux cellules eucaryotes

La capacité d'adhésion *in vitro* des souches de *S. macedonicus*, *S. thermophilus* LF9, *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG, aux trois type de cellules épithéliales intestinales est présentée dans les figures 24, 25, 26. Cette capacité est exprimée en nombre de bactéries adhérentes par cellule eucaryote. Il est à rappeler que le nombre de cellules eucaryote pour les trois modèles utilisés est de $11 \cdot 10^6$ et le nombre initial de bactéries est d'environ 10^{10} UFC/mL.

Les résultats montrent que la capacité d'adhésion aux cellules Caco2-TC7 des souches *S. macedonicus* PA, *S. macedonicus* P2 et *S. macedonicus* LK13 est similaire à celle de *Lb. rhamnosus* GG (environ 4 bactéries/cellule eucaryote). Elle est intermédiaire pour *S. macedonicus* LS5 et *S. thermophilus* LF9 mais reste supérieure à celle de *S. thermophilus* LMD-9 tel que présenté en figure 24.

Par ailleurs, les souches *S. macedonicus* PA et *S. thermophilus* LF9 exercent de bonnes qualités d'adhésion aux cellules à mucus HT29-MTX, environ 13 bactéries par cellule, soit la moitié de la valeur obtenue avec *Lb. rhamnosus* GG. Une plus faible adhésion est soulignée pour les autres souches de *S. macedonicus* et *S. thermophilus* LMD-9 (figure 25).

La même tendance est observée pour le modèle cellulaire HT29-CL16E, où les souches *S. macedonicus* PA et *S. thermophilus* LF9 affichent également les meilleures capacités d'adhésion d'environ 35 bactéries par cellule par rapport aux autres souches de *S. macedonicus* (20 bactéries/cellule) et *S. thermophilus* LMD-9 (7 bactéries/cellule). La capacité d'adhésion la plus forte est attribuée au témoin positif de l'adhésion *Lb. rhamnosus* GG (figure 26).

D'autre part, une meilleure capacité d'adhésion est constatée pour nos souches, dans leur ensemble, aux cellules à mucus intestinal HT29-CL16E par rapport aux HT29-MTX (à mucus gastrique) ou encore aux Caco2-TC7. L'adhésion des souches *S. macedonicus* PA et *S. thermophilus* LF9 est trois fois supérieure aux cellules HT29-MTX qu'aux Caco2-TC7. Ces deux souches adhèrent environ trois fois aux cellules HT29-CL16E qu'aux HT29-MTX. De la même manière, les autres souches de *S. macedonicus* affichent une adhésion aux cellules HT29-CL16E presque 10 fois supérieure à celle du modèle HT29-MTX. Pareillement pour les souches de référence, *Lb. rhamnosus* GG et *S. thermophilus* LMD-9 dont la capacité d'adhésion est 3 à 5 fois stimulée dans le modèle HT29-CL16E par rapport à celui des HT29-MTX.

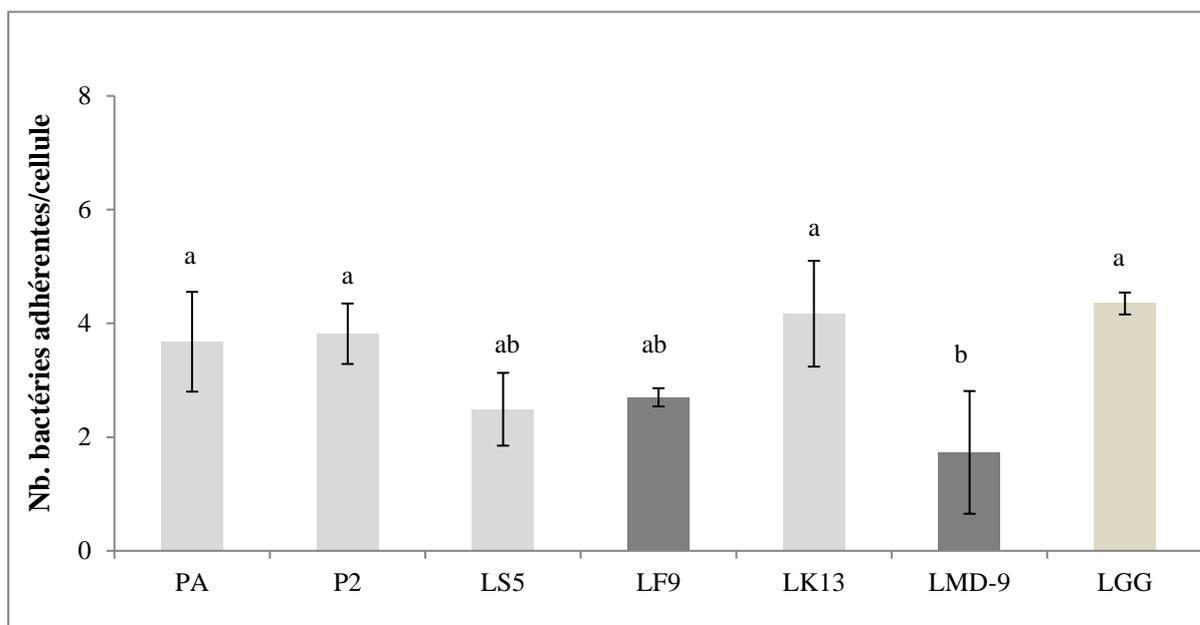


Figure 24. Adhésion *in vitro* des souches de *S. macedonicus*, *S. thermophilus* LF9, *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG (LGG) aux cellules épithéliales Caco-2 TC7

Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries adhérentes (UFC/mL) par cellule eucaryote (11×10^6 cellules eucaryotes/puits) et les moyennes \pm SEM de deux expériences en duplicatas indépendants sont présentées. Les valeurs moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes à $p < 0,05$.

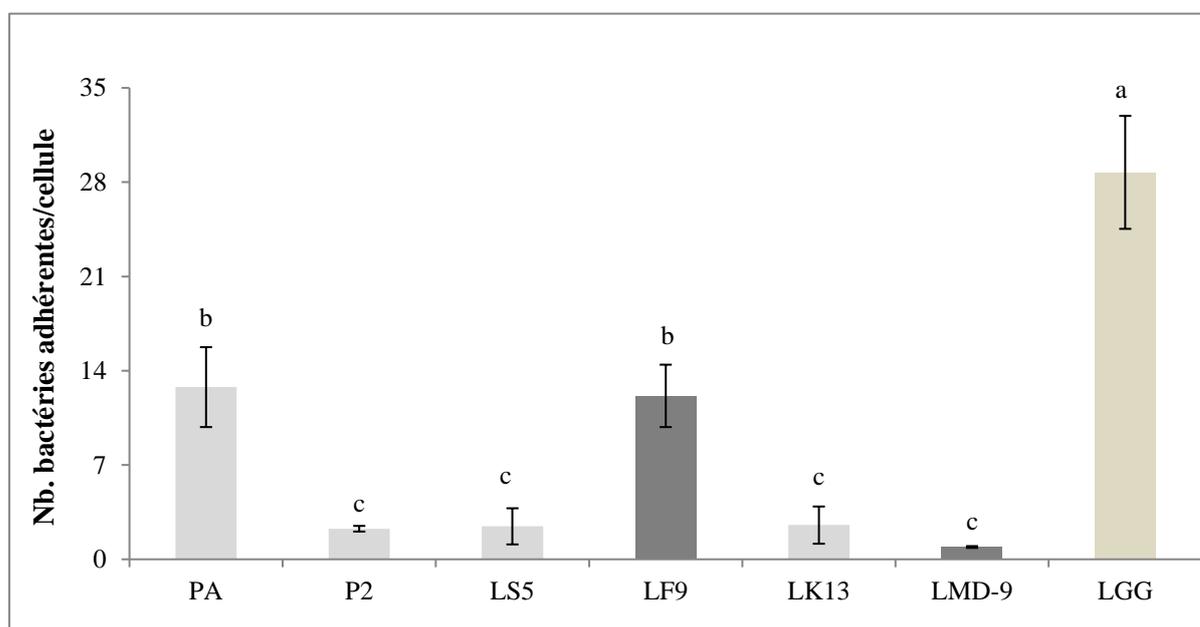


Figure 25. Adhésion *in vitro* des souches de *S. macedonicus*, *S. thermophilus* LF9, *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG (LGG) aux cellules épithéliales HT29-MTX

Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries adhérentes (UFC/mL) par cellule eucaryote (11×10^6 cellules eucaryotes/puits) et les moyennes \pm SEM de deux expériences en duplicatas indépendants sont présentées. Les valeurs moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes à $p < 0,05$.

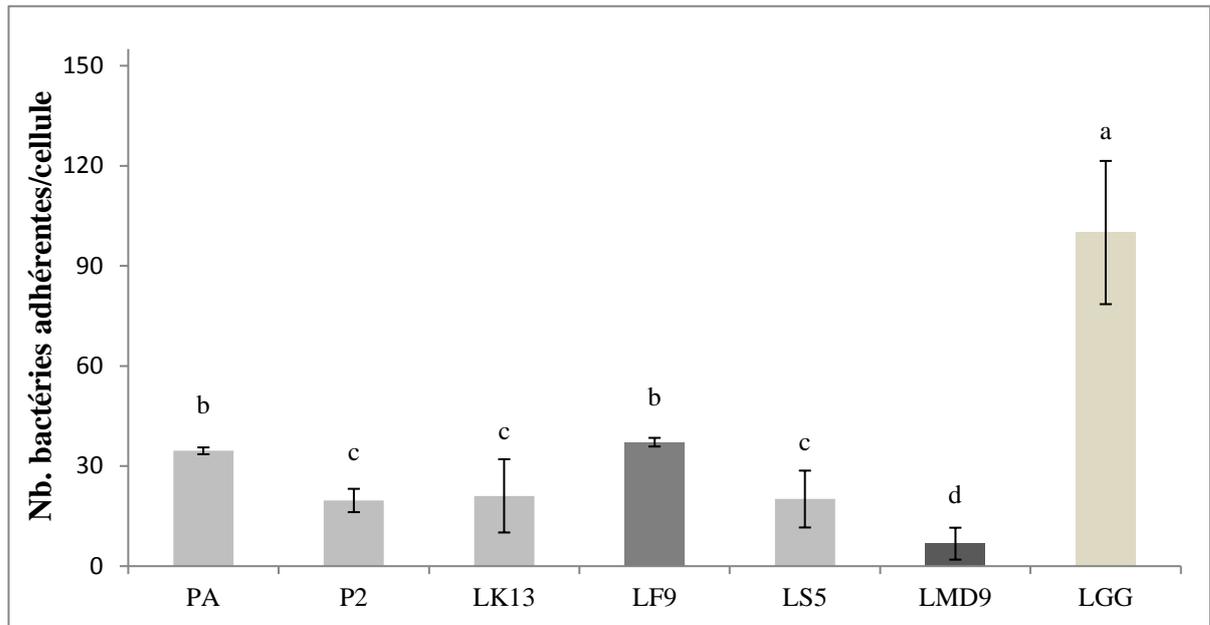


Figure 26. Adhésion *in vitro* des souches de *S. macedonicus*, *S. thermophilus* LF9, *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG (LGG) aux cellules épithéliales HT29-CL16E

Les résultats sont exprimés en nombre de bactéries adhérentes (UFC/mL) par cellule eucaryote (11×10^6 cellules eucaryotes/puits) et les moyennes \pm SEM de deux expériences en duplicatas indépendants sont présentées. Les valeurs moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes à $p < 0,05$.

Globalement, en comparaison à notre témoin positif d'adhésion *Lb. rhamnosus* GG, nos souches, semblent avoir presque les mêmes capacités d'adhésion que le témoin sur Caco-2 alors que sur les cellules à mucus seules les souches *S. macedonicus* PA et *S. thermophilus* LF9 se distinguent par une adhésion modérée.

Ces résultats corroborent le fait que la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales *in vitro* est liée à la souche et dépend probablement de ses caractéristiques intrinsèques, tels que c'est le cas pour *S. macedonicus* PA par rapport aux autres souches *S. macedonicus* testées et de la souche *S. thermophilus* LF9 qui exprime une capacité d'adhésion bien supérieure à celle de *S. thermophilus* LMD-9. En effet, les seules études, au mieux de notre connaissance, évoquant l'adhésion des souches de *S. macedonicus* aux cellules épithéliales intestinales *in vitro* soulignent différents niveaux d'adhésion. Pour Laiño *et al.* (2019), la souche *S. macedonicus* CRL415 possède une bonne capacité d'adhésion aux cellules Caco-2 au même titre que les souches de *S. macedonicus* d'Afrique de l'Est dans les travaux de Jans *et al.* (2016), marquées par une capacité d'adhésion significative aux mucines MUC2. Quant à la souche *S. macedonicus* CIP105865^T testée par Boleij *et al.* (2011), elle adhère modérément aux cellules Caco2 et HT29 (environ 20%). En

revanche, une faible adhésion aux mêmes cellules, avec des taux d'adhésion respectives de 1% et 4%, est attribuée aux souches de *S. macedonicus* explorées par Zoumpoulou *et al.* (2018).

En ce qui concerne l'espèce *S. thermophilus*, Fernandez *et al.* (2018) signalent une faible capacité d'adhésion des souches *S. thermophilus* LMD-9 et *S. thermophilus* LMG18311 par rapport à celle de *L. lactis* TIL448 au mucus de la lignée HT29-MTX. Cette espèce est toutefois, caractérisée par une forte variabilité dans la capacité d'adhésion à la même lignée cellulaire d'après Junjua *et al.* (2016). Les 30 souches de *S. thermophilus* testées par les auteurs ont exprimé des taux d'adhésion variant de moins de 1 jusqu'à 16%. Le taux d'adhésion exprimé par la souche *S. thermophilus* STY-31 aux cellules Caco-2 est d'environ 6% (De Palencia *et al.*, 2008).

Il est à signaler toutefois que dans la littérature, les variabilités dans les capacités d'adhésion d'une même souche à la même lignée cellulaire, pouvant être imputées aux variations des conditions d'expérimentation, sont telles qu'il paraît important de prendre ces données avec précaution. Rien que pour *Lb. rhamnosus* GG, nous retrouvons des taux d'adhésion très variables d'une étude à l'autre pouvant aller de 9 à 40% au mucus (Ouweland *et al.*, 2000 ; Izquierdo, 2009 ; Argyri *et al.*, 2013 ; Nejati et Oelschlaeger, 2015 ; Chaffanel *et al.*, 2018), et de 9 à 34% aux cellules Caco-2 (Schillinger *et al.*, 2005 ; Nejati et Oelschlaeger, 2015). Pour la souche *Bifidobacterium lactis* Bb12, le taux d'adhésion au même modèle Caco-2 varie de 2 à 8,9% entre deux études (De Palencia *et al.*, 2008 ; Laparra et Sanz, 2009).

De plus, la diversité des facteurs de surface bactérienne peut également expliquer les différences du niveau d'adhésion des souches au même type cellulaire. Pour exemple, l'expression de différents niveaux d'EPS par des souches de *Lb. bulgaricus* a conféré des profils d'adhésion différents aux cellules eucaryotes (Jose *et al.*, 2017). En fait, les mécanismes d'adhésion des deux espèces étudiées (*S. thermophilus* et *S. macedonicus*) aux cellules épithéliales intestinales ne sont pas bien élucidés, néanmoins, certaines pistes ont été mises en avant pour l'espèce *S. thermophilus*. Kebouchi *et al.* (2016) ont souligné l'implication de la *srtA* et des protéines dépendantes de la sortase telles que MucBP, prtS, CpdB dans son profil d'adhésion aux cellules Caco2 et HT29-CL16E. Récemment, Tarrah *et al.* (2020), ont constaté la présence de l'opéron *opuCABCD* dans le génome de la souche *S. macedonicus* 211MA présentant une forte capacité d'adhésion aux cellules épithéliales HT29. Ces mêmes auteurs ont suggéré son éventuelle implication dans l'adhésion de la souche étudiée à l'instar de ce qui a été décrit pour *Listeria monocytogenes* LO28 et *Listeria monocytogenes* ScottA. L'élimination de l'opéron *opuC* a considérablement réduit l'adhésion de ces souches bactériennes dans l'intestin des souris après ingestion orale.

Par ailleurs, nos résultats indiquent une différence de la capacité d'adhésion des souches selon le modèle cellulaire et le type de mucus exprimé. Les souches *S. macedonicus* PA et *S. thermophilus* LF9 adhèrent mieux aux cellules à mucus qu'aux cellules sans mucus, ce qui concorde avec les résultats rapportés par Zoumpoulou *et al.* (2018) et Kebouchi *et al.* (2016). En outre, toutes les souches testées expriment une meilleure capacité d'adhésion aux cellules à mucus intestinal HT29-CL16E qu'aux HT29-MTX à mucus gastrique.

A l'évidence, les structures glucidiques des mucines peuvent fournir un site de fixation initial aux bactéries, exemple en est des bactéries pathogènes telles que *E. coli* entérotoxigène qui adhère à la glycoprotéine transmembranaire MUC1 ou encore *Campylobacter jejuni* interagissant au niveau de l'intestin avec la mucine sécrétée MUC2. Des souches de BL telle que *L. lactis* BGKPI adhèrent spécifiquement aux mucines de type gastrique MUC5AC, alors que des souches de *S. macedonicus* se lient au MUC2. Certaines espèces de bifidobactéries sont également connues pour leur adhésion spécifique au mucus. D'ailleurs, il a été rapporté que la production de mucus par les cellules HT29-MTX semble augmenter l'adhésion des cellules bactériennes par rapport aux cellules Caco-2 ou HT29 seules. L'adhésion de certains probiotiques en l'occurrence est significativement inférieure à la lignée Caco-2 par rapport à HT29-MTX (Tu *et al.*, 2008 ; Van Tassell et Miller, 2011 ; Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2012 ; Lukić *et al.*, 2012 ; Nejati et Oelschlaeger, 2015 ; Jans *et al.*, 2016 ; Sicard *et al.*, 2017).

Ces éléments suggèrent une probable affinité des bactéries pour certains types de mucines transmembranaires ou sécrétés et qui pourrait être liée aux propriétés de surface des cellules bactériennes et eucaryotes. Lukić *et al.* (2012) ont démontré que la protéine MbpL de liaison à la mucine gastrique MUC5AC exprimée par la souche *L. lactis* BGKPI était à l'origine de son adhésion à la lignée HT29-MTX. De ce fait, une meilleure adhésion aux cellules à mucus intestinal caractérisant nos souches suggère probablement l'implication effective de facteurs de surface bactérienne de liaisons au mucus spécifiquement aux mucines intestinales telle que MUC2. Effectivement, il a été démontré par Kebouchi *et al.* (2016) que l'inactivation du gène *mucBP* diminue l'adhésion de *S. thermophilus* LMD-9 aux cellules HT29-CL16E et n'a pas d'impact sur l'adhésion aux cellules HT29-MTX montrant ainsi l'implication de la protéine dans la liaison au mucus intestinal.

De surcroît, l'analyse du génome de *S. macedonicus* ACA-DC 198 a révélé la présence de l'opéron pil3 (Papadimitriou *et al.*, 2014). Les pili chez les bactéries probiotiques sont impliqués dans

l'adhésion aux cellules intestinales à l'instar du SpaCBA pilus chez *Lb. rhamnosus* GG qui est lié à l'adhésion aux mucus humain (Kankainen *et al.*, 2009). L'opéron pil3 est également présent dans le génome de *S. gallolyticus* qui est liée phylogénétiquement à *S. macedonicus* et que cette dernière semble l'avoir conservé au cours de son évolution. Chez *S. gallolyticus*, pil3 semble interagir à la fois avec les mucines MUC5AC et MUC2 (Martin *et al.*, 2016). De la même manière, Jans *et al.* (2016) ont souligné la capacité d'adhésion des souches de *S. macedonicus* d'Afrique de l'Est à la mucine MUC2. Ainsi, la présence possible de la protéine pil3 dans les génomes de nos souches *S. macedonicus* pourrait contribuer à leur adhésion au mucus notamment intestinal.

Par ailleurs, il a été indiqué que les pili sont exprimés de façon hétérogène chez *S. gallolyticus* (Jans *et al.*, 2015). Le niveau d'expression des facteurs génétiques incriminés dans l'adhésion bactérienne peut expliquer l'affinité de la souche *S. macedonicus* PA aux cellules à mucus et spécialement intestinal par rapport aux autres souches testées de la même espèce. Par contre, l'absence de pili chez l'espèce *S. thermophilus* indique que d'autres facteurs de surface peuvent contribuer à l'adhésion de la souche *S. thermophilus* LF9 aux cellules à mucus notamment intestinal au même titre que *S. macedonicus* PA. Il pourrait s'agir notamment des protéines dépendantes de la sortase (MucBP) tel que cela a été évoqué plus haut. De plus, il a été rapporté par Kebouchi *et al.* (2016) que l'inactivation du gène *prtS* n'avait pas d'incidence sur l'adhésion aux cellules à mucus tandis qu'il augmentait celle aux cellules Caco-2. Ceci peut expliquer la faible adhésion de *S. thermophilus* LMD-9 à *prtS*⁺ par rapport à celle de *S. thermophilus* LF9, dont la protéase semble inactive, aux Caco-2.

Enfin les mécanismes d'adhésion sont multifactoriels, d'autres acteurs de surface peuvent alors expliquer l'adhésion de nos souches aux lignées utilisées et qui méritent d'être élucidés tels que les protéines de la couche S (*S-layer*), les acides lipotéichoïques (LTA), les EPS, ainsi que les facteurs de surface liés aux cellules eucaryotes favorisant les interactions avec les bactéries.

*Synthèse des résultats
& discussion générale*

Les aliments traditionnels d'une manière générale pourraient être des sources intéressantes de bactéries lactiques diversifiées et souvent différentes des souches commerciales (Bensalah, 2009 ; Prashant *et al.*, 2009). Les potentiels technologiques et probiotiques pouvant être attribués à ces souches justifient l'intérêt de les rechercher dans des produits tels que les laits fermentés fabriqués de manière traditionnelle. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à deux espèces thermophiles non pathogènes du genre *Streptococcus* à savoir *S. thermophilus* et *S. macedonicus* dans le *lben* et le *rayeb* algériens en période estivale.

Le choix de ces laits fermentés en cette période chaude a été motivé par la probabilité de retrouver des souches lactiques thermophiles atypiques dans des produits généralement caractérisés par une microflore mésophile. Les travaux de Bensalah *et al.* (2009) en sont l'exemple, ces auteurs ont isolé une souche de *L. lactis* thermotolérante aux caractéristiques atypiques à l'espèce, à partir de *lben* issu d'une région aride de l'Ouest algérien. Ce type de souches thermotolérantes ainsi que d'autres souches thermophiles telles que *S. macedonicus* et *S. thermophilus* ont également été retrouvés dans des laits de chamelle fermentés spontanément à 42°C en Ethiopie (Fugl *et al.*, 2017).

En outre, Wullschleger (2009) a observé une plus forte charge de bactéries lactiques dans le lait fermenté traditionnel *fènè* fabriqué en saison chaude plutôt que froide. Cette tendance a été rapportée par Franciosi *et al.* (2009) pour des échantillons de lait de vache cru collectés en été. Gaglio *et al.* (2014) ont également indiqué que la proportion de BL thermophiles dans des échantillons de fromages italiens *Vastedda della valle del Belice* produits au printemps est supérieure à celle des BL mésophiles alors qu'aucune différence significative n'a été notée entre les deux types de flores dans ces produits fabriqués en hiver. Il se pourrait alors que la saison affecte le profil du microbiote indigène du lait cru et par conséquent des produits fermentés en favorisant la prolifération des bactéries psychrotolérantes, par exemple, pendant les hivers les plus froids (O'Sullivan et Cotter, 2017). Il ne serait pas surprenant d'assister au développement des souches thermotolérantes durant les saisons les plus chaudes. C'est ainsi que la collecte de nos échantillons a été menée durant la période de juin à septembre à Constantine, une région semi-aride à climat chaud en été avec des températures dépassant souvent les 40°C.

Dans un premier temps, la collecte des échantillons a concerné 40 laits fermentés traditionnels (*lben* et *rayeb*) algériens où ont été isolés 670 coques lactiques thermophiles. L'identification préliminaire des isolats a été effectuée sur gélose LM17 à une température de 42°C en se basant sur l'étude des caractères morphologiques (aspects macro- et microscopique) physiologiques et biochimiques (catalase, croissance en milieux hostiles et dégradation de l'esculine). Parmi ces

coques, 20 sont présumés appartenir aux espèces recherchées, le reste étant des entérocoques, ils ont été majoritairement exclus de la sélection au niveau phénotypique et ce par la mise en évidence de la dégradation de l'esculine. Ce test s'avère particulièrement discriminant pour notre étude et de ce fait recommandé pour les procédures d'isolement de BL dans des produits réputés fortement denses en entérocoques, cas du lait cru et des produits laitiers traditionnels (Bensalah *et al.*, 2011 ; Aissaoui Zitoun *et al.*, 2012 ; Bendimerad *et al.*, 2012). En effet, les méthodes phénotypiques, malgré leurs limites, sont nécessaires et présentent l'avantage de permettre une pré-identification des isolats les plus pertinents dans le cadre d'une démarche de sélection. Cela a réduit considérablement le coût de l'identification génotypique dans notre étude en passant de 670 à une quarantaine d'isolats pour une identification par approches moléculaires.

Le typage génétique par analyse du gène codant l'ARNr 16S et confirmé par l'analyse des espaces intergéniques ITS 16S-23S jusqu'au rang espèce, a permis d'identifier parmi les 20 isolats présumés, 2 souches de *S. thermophilus* et 18 autres de *S. macedonicus*. Alors que les 22 isolats restants affiliés à *S. equinus* et *S. lutetiensis*, ont été écartés de la sélection.

Ces résultats indiquent que la distribution des isolats de *S. thermophilus* et de *S. macedonicus* dans nos échantillons est faible mais concorde avec la littérature puisque de faibles proportions ont été notées pour la première espèce dans les produits laitiers traditionnels algériens et Nord africains (Mezaini *et al.*, 2009 ; Ghalouni *et al.*, 2018). Concernant la proportion de *S. macedonicus* dans nos échantillons, les résultats rejoignent ceux des travaux de Gaglio *et al.* (2014). Néanmoins, des proportions plus conséquentes ont été enregistrées dans d'autres fromages italiens, grecs et dans des laits fermentés traditionnels africains (Pacini *et al.*, 2006 ; Georgalaki *et al.*, 2009 ; Wullschleger, 2009 ; Jans *et al.*; 2012 ; 2013 ; 2017).

Ensuite, afin de discriminer les souches au sein d'une même espèce, deux types d'ITS ont été mis en évidence pour deux isolats de *S. thermophilus* mais aucune distinction n'a été relevée entre les isolats de *S. macedonicus* en ce qui concerne ce marqueur. D'autres marqueurs ont été essayés sans donner de résultats concluants (gène *sodA*, méthode RAPD). Nous avons alors envisagé un schéma MLST pour les deux espèces étudiées en choisissant un isolat par produit. Au total, neuf gènes de ménage ont été explorés pour *S. thermophilus* et 16 pour *S. macedonicus*. En effet, nous ne disposons que d'un seul génome de référence complet pour la seconde espèce, nous nous sommes donc basés sur les gènes de *S. thermophilus* et sur ceux de *S. gallolyticus* suite aux travaux de Shibata *et al.* (2014).

La méthode MLST a permis de différencier les isolats sur la base du séquençage de fragments internes de neuf gènes de ménage pour deux isolats de *S. thermophilus* (LF9 et LA14) et de dix autres gènes parmi les plus discriminants pour quatre isolats de *S. macedonicus* (PA, P2, LK13, LS5). Les profils alléliques ont été établis pour chaque isolat et les pourcentages maximum de divergence des séquences vont de 0,2 à 1,2% pour les isolats de *S. thermophilus* et de 0,2 à 1,5% pour ceux de *S. macedonicus*. Plusieurs études ont rapporté l'efficacité de la méthode MLST dans l'évaluation de la diversité génétique en permettant la discrimination des espèces proches et la différenciation entre les souches d'une même espèce (Delorme *et al.*, 2007 ; 2010 ; 2015 ; Shibata *et al.*, 2014 ; Jans *et al.*, 2016 ; Junjua *et al.*, 2016). Les liens phylogénétiques entre les différents isolats ont été établis en se basant sur les arbres phylogénétiques, construits à l'aide des séquences partielles concaténées des gènes couverts par MLST en utilisant les méthodes Neighbor-Joining. Les résultats obtenus indiquent une faible divergence entre les isolats de *S. macedonicus* et la souche de référence grecque mais qui reste visible et différenciée sur l'arbre. De même l'isolat *S. macedonicus* PA semble relativement se distinguer des autres isolats sur le même arbre. La souche *S. thermophilus* LF9 quant à elle est différenciable des 30 souches de la collection du laboratoire URAFPA (Junjua *et al.*, 2016).

Néanmoins, il faut souligner la faible diversité entre nos isolats pourrait être imputée à l'espèce et à la proximité géographique des isolats, quoique ce lien ne soit pas toujours évident comme le rapportent certaines études (Lombardi *et al.*, 2004 ; Yu *et al.*, 2015). La faible variabilité constatée parmi les souches de *S. thermophilus*, soutenue par le faible polymorphisme (0,15%) observé dans le génome de cette espèce et une diversité plus importante de *S. salivarius* (pouvant atteindre un pourcentage de divergence de 45% au niveau du gène *pepO*) suggèrent que *S. thermophilus* est une espèce qui a récemment émergé du groupe *salivarius*. Ce qui pourrait expliquer l'évolution lente des gènes situés dans le « *core genome* » tels que les gènes de ménage (Bolotin *et al.*, 2004 ; Delorme *et al.*, 2007 ; 2010 ; Junjua *et al.*, 2016).

Quant à *S. macedonicus*, elle appartient au complexe *S. bovis* / *S. equinus*, elle a été isolée dans des cas d'endocardites puis de plus en plus, elle a été retrouvée dans des sources laitières. Les preuves de son adaptation au lait telles que l'opéron lactose propre à *S. macedonicus*, absent chez les autres espèces du complexe *S. bovis* / *S. equinus* et le plasmide pSMA198 appartenant aux lactocoques pCI305/pWV02. La différenciation également des souches d'origine laitières de celles d'origines animale et humaine suggèrent que *S. macedonicus* est une espèce émergente (Papadimitriou *et al.* 2015 ; Jans *et al.* 2016). A l'instar de *S. thermophilus*, elle peut être marquée par une lente évolution des gènes notamment ceux situés au « *core genome* ». La faible

variabilité des séquences nucléotidiques liée à une récente émergence des espèces a été constatée pour de nombreuses espèces pathogènes telles que *S. agalactiae* (Jones *et al.*, 2003 ; Chen, 2019 ; Tarrah *et al.*, 2018b ; 2020).

Dans la continuité de ce travail, les isolats de *S. macedonicus* et de *S. thermophilus* ont été testés sur leur capacité à acidifier le lait. D'après Blaiotta *et al.* (2011) et Lairini *et al.* (2014), les isolats sont classés selon leur vitesse d'acidification en lait (Δ pH de 0,4 unité entre t_0 et un instant t) et la valeur de pH atteinte au bout de 6 h de fermentation.

Nos résultats indiquent que la capacité d'acidification du lait est faible pour l'isolat *S. thermophilus* LF9 tandis qu'elle est forte pour l'isolat *S. thermophilus* LA14. La courbe de ce dernier se superpose à celle de la souche de référence *S. thermophilus* LMD-9. En lait enrichi en bacto-tryptone, la vitesse d'acidification de l'isolat *S. thermophilus* LF9 s'accélère sans pour autant rattraper celle de la souche de référence. Ceci peut indiquer une faible activité protéolytique de cet isolat ne possédant probablement pas de protéase de paroi et pourvu d'un système de peptidases extracellulaires insuffisant. D'autre part, ces résultats mettent l'accent sur la variabilité entre les souches de l'espèce *S. thermophilus* et qui a été rapportés dans les travaux de Galia *et al.* (2009) et Blaiotta *et al.* (2011). Les deux isolats *S. thermophilus* LF9 et *S. thermophilus* LA14 issus de produits différents mais géographiquement proches présentent des capacités d'acidification du lait différentes.

Concernant l'espèce *S. macedonicus*, les 18 isolats sont modérément à faiblement acidifiants en lait. Les plus acidifiants d'entre eux issus de produits différents ont été retenus. Il en ressort que les quatre isolats (*S. macedonicus* PA, *S. macedonicus* P2, *S. macedonicus* LK13 et *S. macedonicus* LS5) ont une capacité d'acidification du lait modérée nuancée par une vitesse de réduction du pH de 0,4 unité en 3,5 h pour les isolats de *S. macedonicus* LK13 et *S. macedonicus* LS5 et en 4,5 h pour les deux autres. En supplémentant le lait en bacto-tryptone, tous ces isolats passent d'une capacité d'acidification modérée à forte.

Enfin, les quatre isolats *S. macedonicus* présentent ainsi une activité acidifiante modérée s'accordant avec les résultats rapportés dans la littérature (Georgalaki *et al.*, 2000 ; Lombardi *et al.*, 2004 ; Blaiotta *et al.*, 2011) mais tout à fait convenable à une éventuelle application en technologie laitière notamment en co-cultures. D'ailleurs, certaines souches ont été utilisées dans des essais de fabrication de fromages et de laits fermentés par certains auteurs. Settani *et al.* (2011) ont utilisé une souche de *S. macedonicus*, à la vitesse d'acidification modérée en lait (pH < 5,5 en 8 h) qu'ils ont considérée comme suffisante pour la fabrication de fromage,

associée à une souche de *Lb. paracasei*. Ce fromage expérimental testé par un panel de sujets était le mieux apprécié pour ses qualités sensorielles. Guarcello *et al.* (2016) ont également employé une souche de *S. macedonicus* avec des souches de *L. lactis* subsp. *lactis*, *E. faecalis* et *Lb. garvieae* pour des essais de fabrication de fromage traditionnel italien. Pareillement pour Fusco *et al.* (2019) qui ont mis en évidence l'emploi d'une souche autochtone de *S. macedonicus*, comme starter ou en co-culture avec d'autres souches, dans la fabrication de fromages traditionnels italiens *giuncata* et *caciotta leccese*. El Hatmi *et al.* (2018) rapportent avoir obtenu un meilleur lait fermenté, en employant deux souches de *S. macedonicus* et une souche de *E. faecium*.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'investigation de quelques pré-requis au potentiel probiotique pour les souches sélectionnées. Afin d'exercer une action positive dans l'organisme, les bactéries probiotiques doivent tout d'abord traverser le TGI et adhérer aux muqueuses intestinales. Ces aptitudes sont indispensables à certains effets probiotiques et sont considérés, par les experts de la FAO et de l'OMS (2002), comme des critères de sélection des souches. A cet effet, les isolats ayant été caractérisés dans la première partie de ce travail ont été testés *in vitro* sur leur capacité à résister à l'acidité gastrique et aux sels biliaires ainsi que leur capacité d'adhésion aux cellules intestinales

Les résistances à l'acidité gastrique et au stress biliaire ont été explorées dans le présent travail par l'exposition des souches à des solutions isotoniques acides (pH 4, 3, 2) ou à des mélanges équimolaires de sels biliaires (MSB : 4, 5, 6, 10 mM) pendant 2 h à 37°C. La résistance des souches a été évaluée par numération des bactéries sur gélose LM17 (UFC) vivantes par rapport à un témoin (pH 7, 0 mM MSB). Les points de pH et de MSB choisis correspondent à ceux des conditions physiologiques rencontrées chez l'homme. Nous avons pris les variations de pH correspondant à celles d'un estomac vide ou lors des repas. Quant aux sels biliaires, nous en avons utilisé trois (un conjugué et deux libres) avec un niveau variable de toxicité et des concentrations habituellement retrouvées dans l'intestin grêle.

La souche *S. macedonicus* PA résiste parfaitement bien aux pH 4 (aucune perte) et 3 (perte < 1 log), les trois autres souches de *S. macedonicus* et la souche *S. thermophilus* LF9 résistent assez bien à ce dernier pH avec des réductions de survie de moins de 2 log. En revanche, aucune de ces souches ne survit à pH 2 contrairement à celles de références.

Concernant la résistance aux SB, les souches *S. macedonicus* LK13 et *S. macedonicus* LS5 se distinguent par leur résistance à 4 mM (aucune perte) et 6 Mm (perte d'un log) en MSB alors que

les pertes de survie sont importantes pour les souches de références *Lb. rhamnosus* GG et *S. thermophilus* LMD-9 (aucune survie pour cette dernière partir de 4 mM). A 10 mM, la souche *S. macedonicus* P2 est la plus sensible, elle n'est plus détectable au même titre que les souches de références. Les autres souches survivent à cette concentration avec des pertes d'environ 3,5 log pour les souches *S. macedonicus* LK13 et *S. macedonicus* LS5 et 4,5 log pour les souches *S. macedonicus* PA et *S. S. thermophilus* LF9.

Ces résultats sont encourageants quant à la résistance de nos souches qui est globalement satisfaisante. Il faut noter que les conditions expérimentales utilisées dans notre protocole sont plus drastiques que ce qui pourrait être rencontré *in vivo* notamment pour les sels biliaires. D'autres facteurs peuvent intervenir, en dehors des caractères intrinsèques de la bactérie et qui permettraient d'atténuer la toxicité des sels biliaires et tamponner le pH de l'estomac. Pour exemple, la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 a été isolée de selles de souris à une concentration proche de celle administrée oralement. Cette souche présentait *in vitro* une sensibilité à l'acidité (aucune survie au bout d'une heure à pH 2,5) et une forte résistance aux sels biliaires (Zoumpopoulou *et al.*, 2008 ; Maragkoudakis *et al.*, 2009). D'autre part, il semblerait, que la toxicité des sels biliaires ait un impact plus important sur la survie des bactéries que l'acidité gastrique. D'ailleurs, un effet choc (0 h) significatif au contact du MSB a été enregistré pour nos souches alors que cela n'a pas été observé pour l'acidité. Dans les conditions physiologiques normales, cette dernière peut être tamponnée par la matrice alimentaire de la bactérie d'où l'intérêt de l'intégration de celle-ci dans un aliment fermenté. Enfin, le comportement de nos souches rejoint celui de la souche *S. macedonicus* ACA-DC 198 *in vitro*. A l'image de celle-ci, nos souches pourraient traverser le TGI dans le contexte d'un bol alimentaire protecteur. De même une adaptation à un stress modéré permettrait, éventuellement d'améliorer leur survie en dessous du pH 3.

L'autre critère important à la caractérisation des souches probiotiques est leur adhésion aux cellules épithéliales intestinales qui a été étudié *in vitro* sur trois modèles de lignées cellulaires d'adénocarcinome colique humain Caco-2 TC7, HT29-MTX et HT29-CL16E. Les cellules du premier modèle ne sécrètent pas de mucus alors que celles des deux autres sont capables de produire du mucus, respectivement, de type gastrique et intestinal. Ces conditions permettent d'exposer nos souches aux différents composants de l'épithélium intestinal afin de se rapprocher au mieux de l'environnement étudié.

La capacité d'adhésion de nos souches aux cellules eucaryotes a été estimée par numération sur gélose LM17 des bactéries (vivantes) ayant adhérees aux cellules intestinales pendant 2 h

d'incubation (bactéries et cellules) à 37°C et les résultats sont exprimés en nombre de bactéries adhérentes par cellule eucaryote.

Les résultats obtenus indiquent que nos souches adhèrent aux cellules Caco-2 TC7 avec une capacité similaire ou intermédiaire à celle de la souche de référence *Lb. rhamnosus* GG et supérieure à celle de *S. thermophilus* LMD-9. Sur le modèle HT29-MTX, les souches *S. macedonicus* PA et *S. thermophilus* LF9 se distinguent des autres par leur capacité d'adhésion atteignant la moitié de celle de la souche *Lb. rhamnosus* GG (28 bactéries/cellule). Ces mêmes souches adhèrent (35 bactéries/cellule) plus que les autres aux cellules HT29-CL16E mais cette adhésion reste inférieure à celle de la souche *Lb. rhamnosus* GG. Une augmentation du niveau d'adhésion de toutes les souches étudiées est également constatée pour ce modèle cellulaire.

Finalement, quel que soit le niveau d'adhésion de nos souches aux trois lignées cellulaires utilisées dans cette étude, nous pouvons, toutefois, affirmer qu'elles ont toutes la capacité d'y adhérer et pourquoi pas de coloniser de façon transitoire l'intestin. Il a été observé que la souche *S. thermophilus* LMD-9, malgré sa faible adhésion aux muqueuses intestinales *in vitro*, pouvait coloniser rapidement le tube digestif de rats gnotobiotiques en présence de lactose. L'inactivation du gène *lacS* (codant le transporteur de lactose à l'intérieur de la cellule) ralentissait la colonisation du tube digestif des rats (Rul *et al.*, 2011 ; Thomas *et al.*, 2011). Cette capacité de colonisation semble être liée à son métabolisme glucidique. Il a également été rapporté que des souches de *S. thermophilus* cultivées en lait présentaient un meilleur niveau d'adhésion aux cellules iléales humaines (Conway *et al.*, 1987). De ce fait, envisager l'incorporation de nos souches dans une matrice laitière pourrait améliorer leur adhésion et entraîner la colonisation du tube digestif.

A la lumière des résultats du présent travail, la variabilité entre les souches d'une même espèce a été soulignée justifiant l'intérêt de prospecter de nouvelles souches dans des produits fermentés traditionnels.

S'agissant de l'espèce *S. thermophilus*, la souche *S. thermophilus* LF9 présente des propriétés bien différentes de la souche de référence *S. thermophilus* LMD-9. Génétiquement, les deux souches affichent deux types d'ITS. Notre souche possède une faible capacité acidifiante du lait tandis qu'elle est forte pour la souche *S. thermophilus* LMD-9. En revanche, la souche *S. thermophilus* LF9 est nettement plus résistante aux sels biliaires que la souche *S. thermophilus* LMD-9, et avec de meilleures capacités d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales *in vitro*.

Concernant l'espèce *S. macedonicus*, la souche *S. macedonicus* PA se distingue des autres souches de la même espèce sur le plan génétique et par sa qualité d'adhésion. Cette différence, bien qu'elle soit faible, reste visible sur l'arbre phylogénétique. La souche *S. macedonicus* PA possède également des capacités d'adhésion plus intéressantes que les autres souches. Elle est plus résistante à pH 3 avec un niveau de survie aux sels biliars satisfaisant. Une capacité d'acidification du lait modérée est notée pour cette souche comme pour l'ensemble des souches de cette espèce. Au regard de ses propriétés, La souche *S. macedonicus* PA a été déposée dans la collection française de bactéries d'origine alimentaire (CIRM-BIA, Rennes, France sous le numéro CIRM-BIA 2314) et son potentiel probiotique mériterait d'être exploré. Les principaux résultats de ce travail sont présentés dans le tableau de synthèse ci- après (tableau 16).

Tableau 16. Synthèse des principaux résultats.

Isolat	Origine	ARNr 16S	ITS 16S-23S	S-Profil allélique MLST	Acidification du lait
PA	Rayeb Rb1FP	<i>S. macedonicus</i>	<i>S. macedonicus</i> ACA-DC 198	1-2-1-1-2-2-2-2-2 (pyrC, ilvC, pta, recN, ddlA, dpr, gmK, parC, rpoD, serB)	pH < 6 (6 h) Δ pH 0,4 : 4,5 h Modérée
P2	Rayeb Rb2FP	<i>S. macedonicus</i>	<i>Idem</i>	2-2-2-1-2-2-2-2-2 (pyrC, ilvC, pta, recN, ddlA, dpr, gmK, parC, rpoD, serB)	pH < 6 (6 h) Δ pH 0,4 : 4,5 h Modérée
LK13	Lben LbK1	<i>S. macedonicus</i>	<i>Idem</i>	2-2-2-1-2-2-2-2-1-2 (pyrC, ilvC, pta, recN, ddlA, dpr, gmK, parC, rpoD, serB)	pH < 6 (6 h) Δ pH 0,4 : 3,5 h Modérée
LS5	Lben LbS	<i>S. macedonicus</i>	<i>Idem</i>	2-1-2-2-2-2-2-2-2 (pyrC, ilvC, pta, recN, ddlA, dpr, gmK, parC, rpoD, serB)	pH < 6 (6 h) Δ pH 0,4 : 3,5 h Modérée
LF9	Lben LbFb2	<i>S. thermophilus</i>	Type I	7-1-4-1-17-6-1-10 (glcK, ddlA, pepO, ilvC, thrS, tkt, pyrE, dnaE, serB)	pH ≈ 6 (6 h) Δ pH 0,4) > 5 h Faible
LA14	Lben LbA	<i>S. thermophilus</i>	Type II	1-1-2-1-2-7-5-1-3 (glcK, ddlA, pepO, ilvC, thrS, tkt, pyrE, dnaE, serB)	pH < 5 (6 h) Δ pH 0,4 < 3 h Forte
LMD-9 ^a	Yaourt	<i>S. thermophilus</i>	Type II	1-1-2-1-2-7-5-1-3 (glcK, ddlA, pepO, ilvC, thrS, tkt, pyrE, dnaE, serB)	pH < 5 (6 h) Δ pH 0,4 < 3 h Forte

a : souche de référence *S. thermophilus* LMD-9 (ATCC® BAA-491™); **b** : souche de référence : *Lb. rhamnosus* GG (ATCC® 53103™); **c** : réduction de survie après 1 h d'exposition ; Δ pH : variation de pH ; MSB : mélange équimolaire de sels biliaires ; R.S : réduction de survie (RS = 0 : réduction non significative de survie) ; Bact : bactérie ; (-) négatif.

Tableau 16. Synthèse des principaux résultats (suite).

Isolat	Résistance à l'acidité gastrique simulée			Résistance au MSB			Adhésion <i>in vitro</i> aux cellules épithéliales intestinales		
	pH 4	pH 3	pH 2	4 mM	6 mM	10 mM	Caco2-TC7	HT29-MTX	HT29-CL16E
PA	R.S = 0	R.S < 1 log	Survie : 0	R.S = 0,9 log	R.S = 2,5 log	R.S = 4,6 log	≈ 4 bact/cellule	13 bact/cellule	35 bact/cellule
P2	R.S < 1 log	R.S = 1,9 log	Survie : 0	R.S = 1,2 log	R.S = 4,6 log	Survie : 0	≈ 4 bact/cellule	2,3 bact/cellule	20 bact/cellule
LK13	R.S < 1 log	R.S = 1,5 log	Survie : 0	R.S = 0	R.S = 1 log	R.S = 3,6 log	≈ 4 bact/cellule	2,5 bact/cellule	21 bact/cellule
LS5	R.S : 1,3 log	R.S = 1,8 log	Survie : 0	R.S = 0	R.S = 1 log	R.S = 3,5 log	2,5 bact/cellule	2,5 bact/cellule	20 bact/cellule
LF9	R.S < 1 log	R.S = 1,8 log	Survie : 0	R.S = 1,8 log	R.S = 3,6 log	R.S = 4,3 log	2,7 bact/cellule	12 bact/cellule	37 bact/cellule
LMD-9 ^a	R.S = 0	R.S < 1 log	R.S ^c = 3,3 log	Survie : 0	Survie : 0	Survie : 0	1,7 bact/cellule	0,9 bact/cellule	7 bact/cellule
LGG ^b	R.S = 0	R.S < 1 log	R.S ^c = 5,8 log	R.S = 3,7 log	R.S = 6,5 log	Survie : 0	≈ 4 bact/cellule	28 bact/cellule	146 bact/cellule

Conclusion générale
et
Perspectives

Face à l'intérêt grandissant pour la sélection de souches lactiques autochtones à potentiel probiotique, ce travail se proposait de fournir de nouvelles souches de streptocoques lactiques : *S. thermophilus* et *S. macedonicus*. La première est la seule espèce du genre *Streptococcus* couramment utilisée en industrie laitière et pouvant conférer des effets bénéfiques à l'hôte. La seconde, quant à elle, est une nouvelle espèce, encore peu connue, aux propriétés technologiques et probiotiques prometteuses.

Effectivement, nous retrouvons dans les produits laitiers fermentés traditionnels des bactéries à potentiel probiotique, intéressantes pour de nouvelles applications. A partir de ces produits, nous avons caractérisé de nouvelles souches de *S. thermophilus* et *S. macedonicus* différenciables du point de vue génétique de celles de référence (*S. thermophilus* LMD-9 et *S. macedonicus* ACA-DC 198). Ces souches présentent une activité acidifiante, globalement modérée pouvant justifier leur application en co-culture en industrie laitière, et possèdent les principaux pré-requis nécessaires aux effets probiotiques. Souvent, les propriétés étudiées *in vitro* permettent de prédire le comportement *in vivo* susceptible d'être confirmé par des modèles animaux.

Outre ces résultats, nous avons mis l'accent sur certains outils méthodologiques permettant de se rapprocher au mieux des conditions physiologiques. Il s'agit notamment de l'utilisation du mélange équimolaire de sels biliaires (constitué de sels biliaires primaire et secondaire) au lieu de la bile bovine couramment utilisée dans ce type d'étude, et dont la composition est mal connue. En ce qui concerne l'évaluation de la capacité d'adhésion, nous avons inclus trois lignées cellulaires d'origine humaine afin de mettre en contact nos souches avec différentes molécules de surface, retrouvées dans l'épithélium intestinal et qui sont exprimées dans chaque modèle. Il s'agit des cellules entérocytaires Caco2-TC7 et des lignées HT29-MTX et HT29-CL16E productrices de mucus, respectivement, de types gastrique et intestinal. Ce dernier modèle n'est pas couramment investigué, il mérite d'être généralisé pour l'étude de l'adhésion.

Cette première caractérisation ouvre ainsi la voie pour l'exploration d'éventuels effets probiotiques. Le renforcement de la barrière intestinale en est un exemple. Il était prévu d'être investigué pour nos souches. D'ailleurs, une mise au point a été réalisée dans le travail de thèse de Kebouchi en 2017 afin d'explorer l'impact de l'adhésion de la souche *S. thermophilus* LMD-9 sur le renforcement de l'effet barrière de l'épithélium intestinal *in vitro*. Il était question de quantifier le niveau d'expression des gènes codant les mucines sécrétées MUC2 et MUC5AC dans les trois lignées cellulaires. Cependant, les résultats obtenus à l'issue de ces expérimentations préliminaires nécessitent d'être confirmés. Des modifications des conditions expérimentales

seraient exigées pour explorer l'effet barrière quant à nos souches, en l'occurrence *S. macedonicus* PA et *S. thermophilus* LF9.

D'autres effets probiotiques peuvent être explorées pour l'ensemble de nos souches et particulièrement les plus intéressantes d'entre elles tels que l'effet antimicrobien (production de bactériocines, d'acides organiques), la production de folates et de composés bioactifs, et les effets anti-inflammatoire ou encore immunomodulant notamment pour les souches les plus adhérentes.

Le séquençage du génome notamment celui de la souche *S. macedonicus* PA serait extrêmement intéressant car cela permettrait d'un côté, d'établir officiellement son innocuité, en vérifiant l'absence de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques, afin de généraliser son application. D'un autre côté, le séquençage du génome est un moyen pour mieux appréhender les mécanismes de résistance au stress et d'adhésion aux cellules épithélial et qui sont encore méconnus pour l'espèce *S. macedonicus*.

D'autre part, l'investigation des propriétés technologiques de l'ensemble des souches est nécessaire pour optimiser leur application en industrie alimentaire telles que les activités lipolytique, peptidasique, l'utilisation de citrate et la production d'EPS notamment pour la souche *S. thermophilus* LF9. Au vu de l'innocuité assurée de cette espèce, elle pourrait d'ores et déjà être appliquée en co-culture.

*Références
bibliographiques*

A

- Abd El Gawad, I. A., Abd El Fatah, A. M., & Al Rubayyi, K. A. (2010). Identification and characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional rayeb milk in Egypt. *J Am Sci*, 6(10), 728-35.
- Abdelgadir, W., Nielsen, D. S., Hamad, S., & Jakobsen, M. (2008). A traditional Sudanese fermented camel's milk product, Gariss, as a habitat of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. *International journal of food microbiology*, 127(3), 215-219.
- Abed, R. M. M. (2008). Nucleic acid-based techniques for studying diversity and activity of bacterial communities in oil-contaminated sediments. In: Kassim T.A., Barceló D. (eds) *Contaminated Sediments. The Handbook of Environmental Chemistry*, vol 5T. Springer, pp 97-160.
- Adams, C. A. (2010). The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutrition research reviews*, 23(1), 37-46.
- Adesulu-Dahunsi, A. T., Sanni, A. I., & Jeyaram, K. (2017). Rapid differentiation among *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Weissella* species from some Nigerian indigenous fermented foods. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 39-44.
- Aiba, Y., Ishikawa, H., Tokunaga, M., & Komatsu, Y. (2017). Anti-Helicobacter pylori activity of non-living, heat-killed form of lactobacilli including *Lactobacillus johnsonii* No. 1088. *FEMS microbiology letters*, 364(11), fnx102.
- Aissaoui Zitoun, O., Pediliggieri, C., Benatallah, L., Lortal, S., Licitra, G., Zidoune, M. N., & Carpino, S. (2012). Bouhezza, a traditional Algerian raw milk cheese, made and ripened in goatskin bags. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10(2), 289-295.
- Akabanda, F., Owusu-Kwarteng, J. R. L. K., Glover, R., & Tano-Debrah, K. (2010). Microbiological characteristics of Ghanaian traditional fermented milk product, Nunu. *Nature and Science*, 8(9), 178-187.
- Akhmetsadykova, S. (2012). Impact de la pollution sur la qualité du lait de chamelle au Kazakhstan. *Thèse de doctorat. Biotechnologie, Microbiologie, SupAgro Montpellier*, 72p.
- Alessandria, V., Ferrocino, I., De Filippis, F., Fontana, M., Rantsiou, K., Ercolini, D., & Cocolin, L. (2016). Microbiota of an Italian Grana-like cheese during manufacture and ripening, unraveled by 16S rRNA-based approaches. *Applied and environmental microbiology*, 82(13), 3988-3995.
- Alp, G., & Aslim, B. (2010). Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, 16(2), 101-105.
- Altamimi, M., Abdelhay, O., & Rastall, R. A. (2016). Effect of oligosaccharides on the adhesion of gut bacteria to human HT-29 cells. *Anaerobe*, 39, 136-142.
- Andreu, P., Perret, C., & Romagnolo, B. (2006). Wnt et cellules souches intestinales: des liaisons dangereuses... *médecine/sciences*, 22(8-9), 693-695.
- Andrianifahanana, M., Moniaux, N., & Batra, S. K. (2006). Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1765(2), 189-222.
- Andrighetto, C., Borney, F., Barmaz, A., Stefanon, B., & Lombardi, A. (2002). Genetic diversity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian traditional cheeses. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 141-144.
- Andrus, J. M., Bowen, S. W., Klaenhammer, T. R., & Hassan, H. M. (2003). Molecular characterization and functional analysis of the manganese-containing superoxide dismutase gene (*sodA*) from *Streptococcus thermophilus* AO54. *Archives of biochemistry and biophysics*, 420(1), 103-113.
- Antoine, J. M. (2011). Les ferments lactiques et les laits fermentés: nature et effets. *Phytothérapie*, 9(2), 76-81.

- Arena, S., D'Ambrosio, C., Renzone, G., Rullo, R., Ledda, L., Vitale, F., Maglione, G., Varcamonti, M., Ferrara, L., & Scaloni, A. (2006). A study of *Streptococcus thermophilus* proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations. *Proteomics*, 6(1), 181-192.
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food microbiology*, 33(2), 282-291.
- Arioli, S., Guglielmetti, S., Amalfitano, S., Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., Giovannetti, L., & Mora, D. (2014). Characterization of tetA-like gene encoding for a major facilitator superfamily efflux pump in *Streptococcus thermophilus*. *FEMS microbiology letters*, 355(1), 61-70.
- Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews Immunology*, 8(6), 411.
- Augeron, C., & Laboisse, C. L. (1984). Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer research*, 44(9), 3961-3969.
- Awad, S., Hassan, A. N., & Muthukumarappan, K. (2005). Application of exopolysaccharide-producing cultures in reduced-fat Cheddar cheese: Texture and melting properties. *Journal of Dairy Science*, 88(12), 4204-4213.
- Axelsson, L., & Ahrné, S. (2000). Lactic acid bacteria. In: Priest F. G., & Goodfellow, M. *Applied microbial systematics*, Kluwer Academic Press, 367-388.

B

- Bahloul, H. A., Miloud, H., & Kihal, M. (2019). Isolation and Characterization of Bifidobacteria from diverse ecosystems. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 8(2), 43-48.
- Bahri, F., Lejeune, A., Dubois-Dauphin, R., El Mejdoub, T., Boulahrouf, A., & Thonart, P. (2014). Characterization of *Lactobacillus* strains isolated from Algerian children faeces for their probiotic properties. *African Journal of Microbiology Research*, 8(3), 297-303.
- Bajor, A., Gillberg, P. G., & Abrahamsson, H. (2010). Bile acids: short and long term effects in the intestine. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 45(6), 645-664.
- Bayili, G. R., Johansen, P., Nielsen, D. S., Sawadogo-Lingani, H., Ouedraogo, G. A., Diawara, B., & Jespersen, L. (2019). Identification of the predominant microbiota during production of lait caillé, a spontaneously fermented milk product made in Burkina Faso. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(7), 100.
- Beales, N. 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 1-20.
- Beausoleil, M., Fortier, N., Guénette, S., L'Ecuyer, A., Savoie, M., Franco, M., Lachaine, J., & Weiss, K. (2007). Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* C11285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(11), 732-736.
- Begley, M., Gahan, C. G., & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS microbiology reviews*, 29(4), 625-651.
- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(3), 1729-1738.
- Bencharif, A. (2001). Stratégies des acteurs de la filière lait en Algérie: état des lieux et problématiques. *Options Méditerranéennes Série B Etudes et Recherches*, 32, 25-45.

- BenChetrit, E., Wiener-Well, Y., Kashat, L., Yinnon, A. M., & Assous, M. V. (2017). *Streptococcus bovis* new taxonomy: does subspecies distinction matter?. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(2), 387-393.
- Bendimerad, N., Kihal, M., & Berthier, F. (2012). Isolation, identification, and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation. *Dairy science & technology*, 92(3), 249-264.
- Benkerroum, N. (2013). Traditional fermented foods of North African countries: technology and food safety challenges with regard to microbiological risks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 54-89.
- Benkerroum, N., & Tamime, A. Y. (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (Iben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiology*, 21(4), 399-413.
- Bennama, R. (2012) *Streptococcus thermophilus*: Isolement et recherche systématique de souches indigènes productrices d'exopolysaccharides. *Thèse de doctorat. Microbiologie alimentaire et industrielle. Département de biologie, faculté des sciences. Université'Oran Es-Sénia*, 163 p.
- Bensalah, F., Delorme, C., & Renault, P. (2009). Characterisation of thermotolerant cocci from indigenous flora of 'leben' in algerian arid area and DNA identification of atypical *Lactococcus lactis* strains. *Current microbiology*, 59(2), 139-146.
- Bensalah, F., Labtar, A., Delorme, C., & Renault, P. (2011). Occurrence, isolation and DNA identification of involved in Algerian traditional butter 'Smen'. *African Journal of Biotechnology*, 10(75), 17251-17257.
- Ben-Yahia, L., Mayeur, C., Rul, F., & Thomas, M. (2012). Growth advantage of *Streptococcus thermophilus* over *Lactobacillus bulgaricus* in vitro and in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. *Beneficial microbes*, 3(3), 211-219.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International dairy journal*, 11(4-7), 259-274.
- Berhe, T., Ipsen, R., Seifu, E., Kurtu, M. Y., Fugl, A., & Hansen, E. B. (2019). Metagenomic analysis of bacterial community composition in Dhanaan: Ethiopian traditional fermented camel milk. *FEMS microbiology letters*, 366(Supplement_1), i127-i132.
- Berthier, F., & Ehrlich, S. D. (1998). Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS microbiology letters*, 161(1), 97-106.
- Bessaoud O., Pellissier J. P., Rolland J. P., & Khechimi W. (2019). Rapport de synthèse sur l'agriculture en Algérie, Projet D'appui à l'initiative ENPARD Méditerranée.
- Bhushan, B., Tomar, S. K., & Chauhan, A. (2017). Techno-functional differentiation of two vitamin B 12 producing *Lactobacillus plantarum* strains: an elucidation for diverse future use. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(2), 697-709.
- Bi, J., Liu, S., Du, G., & Chen, J. (2016). Bile salt tolerance of *Lactococcus lactis* is enhanced by expression of bile salt hydrolase thereby producing less bile acid in the cells. *Biotechnology letters*, 38(4), 659-665.
- Blaiotta, G., La Gatta, B., Di Capua, M., Di Luccia, A., Coppola, R., & Aponte, M. (2013). Effect of chestnut extract and chestnut fiber on viability of potential probiotic *Lactobacillus* strains under gastrointestinal tract conditions. *Food microbiology*, 36(2), 161-169.

- Blaiotta, G., Sorrentino, A., Ottombrino, A., & Aponte, M. (2011). Technological and genotypic comparison between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* strains coming from the same dairy environment. *Journal of dairy science*, 94(12), 5871-5877.
- Boke, H., Aslim, B., & Alp, G. (2010). The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yogurt starter bacteria. *Archives of Biological Sciences*, 62(2), 323-328.
- Boleij, A., Muytjens, C. M., Bukhari, S. I., Cayet, N., Glaser, P., Hermans, P. W., Swinkels, D. W., Bolhuis, A., & Tjalsma, H. (2011). Novel clues on the specific association of *Streptococcus gallolyticus* subsp *gallolyticus* with colorectal cancer. *Journal of Infectious Diseases*, 203(8), 1101-1109.
- 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., Burteau S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A., & Hols, R.(2004). Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature biotechnology*, 22(12), 1554-1558.
- Booth, I. R. (2002). Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1-2), 19-30.
- Bourlioux, P. (2007). Histoire des laits fermentés. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42, 9-14.
- Bove, P., Russo, P., Capozzi, V., Gallone, A., Spano, G., & Fiocco, D. (2013). *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis. *Microbiological research*, 168(6), 351-359.
- Boyd, D. A., Cvitkovitch, D. G., Bleiweis, A. S., Kiriukhin, M. Y., Debabov, D. V., Neuhaus, F. C., & Hamilton, I. R. (2000). Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 6055-6065.
- Bozoudi, D., Torriani, S., Zdragas, A., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2016). Assessment of microbial diversity of the dominant microbiota in fresh and mature PDO Feta cheese made at three mountainous areas of Greece. *LWT-Food Science and Technology*, 72, 525-533.
- Brasca, M., Hogenboom, J. A., Morandi, S., Rosi, V., D’Incecco, P., Silvetti, T., & Pellegrino, L. (2016). Proteolytic activity and production of γ -aminobutyric acid by *Streptococcus thermophilus* cultivated in microfiltered pasteurized milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(45), 8604-8614.
- Broadbent, J. R., Larsen, R. L., Deibel, V., & Steele, J. L. (2010). Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *Journal of bacteriology*, 192(9), 2445-2458.
- Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg, C. J., & Moineau, S. (2003). Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *Journal of dairy science*, 86(2), 407-423.
- Bron, P. A., Molenaar, D. O. U. W. E., de Vos, W. M., & Kleerebezem, M. I. C. H. I. E. L. (2006). DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4), 728-738.
- Bulard, E. (2012). L’adhésion bactérienne sondée à l’échelle moléculaire. *Thèse de doctorat. Physique. Université Paris Sud-Paris XI*, 185 p.
- Burton, J. P., Chanyi, R. M., & Schultz, M. (2017). Common Organisms and Probiotics: *Streptococcus thermophilus* (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*). In: Floch, M. H., Ringel, Y., Walker, W. A. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, Boston: Academic Press, 165-169.

Bustos, A. Y., de Valdez, G. F., Fadda, S., & Taranto, M. P. (2018). New insights into bacterial bile resistance mechanisms: the role of bile salt hydrolase and its impact on human health. *Food Research International*, 112:250–62

C

- Call, E. K., Goh, Y. J., Selle, K., Klaenhammer, T. R., & O’Flaherty, S. (2015). Sortase-deficient lactobacilli: effect on immunomodulation and gut retention. *Microbiology*, 161(Pt 2), 311.
- Callon, C., Millet, L., & Montel, M. C. (2004). Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *Journal of Dairy Research*, 71(2), 231-244.
- Canani, R. B., P. Cirillo, Terrin, G., Cesarano, L., Spagnuolo M. I., De Vincenzo, A., Albano, F., Passariello, A., De Marco, G., Manguso, F., & Guarino, A. (2007). “Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children randomized clinical trial of five different preparations. *BMJ*, 2007, 335, 340.
- Cancilla, M. R., Powell, I. B., Hillier, A. J., & Davidson, B. E. (1992). Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with 32P and fluorescent labels. *Applied and environmental microbiology*, 58(5), 1772-1775.
- Cappa, F., Cattivelli, D., & Cocconcelli, P. S. (2005). The *uvrA* gene is involved in oxidative and acid stress responses in *Lactobacillus helveticus* CNBL1156. *Research in microbiology*, 156(10), 1039-1047.
- Carafa, I., Stocco, G., Nardin, T., Larcher, R., Bittante, G., Tuohy, K., & Franciosi, E. (2019). Production of naturally γ -aminobutyric acid-enriched cheese using the dairy strains *Streptococcus thermophilus* 84C and *Lactobacillus brevis* DSM 32386. *Frontiers in microbiology*, 10, 93.
- Carrier, V. (1997). Le stress bactérien et ses applications en microbiologie des aliments. *Séance du jeudi 20 mars 1997*. Bull. Acad. Vét. de France, 70, 355-362.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), 278-288.
- Cats, A., Kuipers, E. J., Bosschaert, M. A. R., Pot, R. G. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Kusters, J. G. (2003). Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing milk drink in *Helicobacter pylori*-colonized subjects. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 17(3), 429-435.
- Cazorla, S. I., Maldonado-Galdeano, C., Weill, R., De Paula, J., & Perdigón, G. D. (2018). Oral administration of probiotics increases paneth cells and intestinal antimicrobial activity. *Frontiers in microbiology*, 9, 736.
- Cerdó, T., García-Santos, J. A., G Bermúdez, M., & Campoy, C. (2019). The role of probiotics and prebiotics in the prevention and treatment of obesity. *Nutrients*, 11(3), 635.
- Chae, J. P., Valeriano, V. D., Kim, G. B., & Kang, D. K. (2013). Molecular cloning, characterization and comparison of bile salt hydrolases from *Lactobacillus johnsonii* PF 01. *Journal of applied microbiology*, 114(1), 121-133.
- Chaffanel, F. (2016). Diversité génétique et phénotypique d'une collection de souches de *Streptococcus salivarius*: étude des éléments intégratifs et des capacités d'adhésion aux cellules des écosystèmes digestif et buccal. *Thèse de doctorat. Procédés biotechnologiques et alimentaires. Université de Lorraine*, 178 p.
- Chaffanel, F., Charron-Bourgoin, F., Soligot, C., Kebouchi, M., Bertin, S., Payot, S., Le Roux, Y., & Leblond-Bourget, N. (2018). Surface proteins involved in the adhesion of *Streptococcus salivarius* to human intestinal epithelial cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(6), 2851-2865.
- Chang, O. K. (2011). Caractérisation d'une forme extracellulaire soluble de la protéase PrtS chez *Streptococcus thermophilus* 4F44. Mise en évidence et détermination de ses sites de coupure sur les caséines. *Thèse de doctorat, Sciences agronomiques. Institut National Polytechnique de Lorraine*, 227 p.

- Chang, O. K., Perrin, C., Galia, W., Saulnier, F., Miclo, L., Roux, E., Driou, A., Humbert, G., & Dary, A. (2012). Release of the cell-envelope protease PrtS in the growth medium of *Streptococcus thermophilus* 4F44. *International Dairy Journal*, 23(2), 91-98.
- Chaves, A. C. S. D., Fernandez, M., Lerayer, A. L. S., Mierau, I., Kleerebezem, M., & Hugenholtz, J. (2002). Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5656-5662.
- Chebeňová-Turcovská, V., Ženišová, K., Kuchta, T., Pangallo, D., & Brežná, B. (2011). Culture-independent detection of microorganisms in traditional Slovakian bryndza cheese. *International journal of food microbiology*, 150(1), 73-78.
- Chen, M., Sun, Q., Giovannucci, E., Mozaffarian, D., Manson, J. E., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2014). Dairy consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. *BMC medicine*, 12, 215.
- Chen, S. L. (2019). Genomic Insights into the Distribution and Evolution of Group B Streptococcus. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1447-.
- Chen, X., Sun, Z., Meng, H., & Zhang, H. (2009). The acid tolerance association with expression of H⁺-ATPase in *Lactobacillus casei*. *International journal of dairy technology*, 62(2), 272-276.
- Chen, Y., Zhang, M., & Ren, F. (2019). A Role of Exopolysaccharide Produced by *Streptococcus thermophilus* in the Intestinal Inflammation and Mucosal Barrier in Caco-2 Monolayer and Dextran Sulphate Sodium-Induced Experimental Murine Colitis. *Molecules*, 24(3), 513.
- Cheriguene, A., Chougrani, F., & Bensoltane, A. (2006). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian goat's milk. *Pakistan J. Biological Sci*, 7, 1242-1249.
- Cho, S. A., Kim, K. S., Do, J. R., Kim, S. H., & Lim, S. D. (2010). Physiological characteristics and immunomodulating activity of *Streptococcus macedonicus* LC743 isolated from raw milk. *Food Science of Animal Resources*, 30(6), 957-965.
- Cho, S. A., Kim, K. S., & Lim, S. D. (2012). Effects of mozzarella cheese manufactured by *S. macedonicus* LC743 on the immune status of mouse. *Food Science of Animal Resources*, 32(1), 40-44.
- Claps, S., & Morone, G. (2011). Produits laitiers et fromagers traditionnels de l'Algérie. In: Développement de la Filière laitière et Fromagère en Algérie, CorFilac: 57-77.
- Cocconcelli, P. S., Porro, D., Galandini, S., & Senini, L. (1995). Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Letters in Applied Microbiology*, 21(6), 376-379.
- Coconnier, M. H., Klaenhammer, T. R., Kerneis, S., Bernet, M. F., & Servin, A. L. (1992). Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(6), 2034-2039.
- Collado, M. C., Isolauri, E., Salminen, S., & Sanz, Y. (2009). The impact of probiotic on gut health. *Current drug metabolism*, 10(1), 68-78.
- Colmin, C., Pebay, M., Simonet, J. M., & Decaris, B. (1991). A species-specific DNA probe obtained from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* detects strain restriction polymorphism. *FEMS microbiology letters*, 81(2), 123-128.
- Cone, R. A. (2009). Barrier properties of mucus. *Advanced drug delivery reviews*, 61(2), 75-85.
- Conway, P. L., Gorbach, S. L., & Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of dairy science*, 70(1), 1-12.
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G., & Ross, R. P. (2008). Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated. *Current pharmaceutical design*, 14(14), 1382-1399.

- Corredoira, J., Rabuñal, R., & Alonso, M. P. (2017). *Streptococcus bovis*: 100 years of an intriguing pathogen. *Clinical Microbiology Newsletter*, 39(1), 1-9.
- Cotter, P. D., & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(3), 429-453.
- Coudeyras, S., & Forestier, C. (2010). Microbiota and probiotics: effects on human health. *Canadian journal of microbiology*, 56(8), 611-650.
- Couvigny, B., Thériat, C., Gautier, C., Renault, P., Briandet, R., & Guédon, E. (2015). *Streptococcus thermophilus* biofilm formation: a remnant trait of ancestral commensal life?. *PLoS one*, 10(6), e0128099.
- Cruchet, S., Obregon, M. C., Salazar, G., Diaz, E., & Gotteland, M. (2003). Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on Helicobacter pylori colonization in children. *Nutrition*, 19(9), 716-721.
- Cui, Y., Xu, T., Qu, X., Hu, T., Jiang, X., & Zhao, C. (2016). New Insights into various production characteristics of *Streptococcus thermophilus* strains. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1701.

D

- Dahou, A., Homrani, A., Bensaleh, F., & Medjahed, M. (2015). La microflore lactique d'un fromage traditionnel Algérien «type j'ben»: connaissance des écosystèmes microbiens laitiers locaux et de leurs rôles dans la fabrication des fromages. *Afrique SCIENCE*, 11(6), 1-13.
- Dal Bello, B., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T., & Cocolin, L. (2010). Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(7), 1151-1159.
- Dandoy, D., Fremaux, C., de Frahan, M. H., Horvath, P., Boyaval, P., Hols, P., & Fontaine, L. (2011). The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS. *Microbial cell factories, BioMed Central*, 10 (1), 21.
- De Angelis M, Bini L, Pallini V, Cocconcelli PS, Gobbetti M (2001) The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology* 147, 1863–1873.
- De Angelis, M., Di Cagno, R., Huet, C., Crecchio, C., Fox, P. F., & Gobbetti, M. (2004). Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(3), 1336-1346.
- De Palencia, P. F., López, P., Corbí, A. L., Peláez, C., & Requena, T. (2008). Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *European Food Research and Technology*, 227(5), 1475-1484.
- De Vrese, M., & Schrezenmeir, J. (2002). Probiotics and non-intestinal infectious conditions. *British Journal of Nutrition*, 88(S1), 59-66.
- De Vuyst, L., & Tsakalidou, E. (2008). *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *International dairy journal*, 18(5), 476-485.
- De Vuyst, L., F. De Vin, F. Vaningelgem, and B. Degeest. 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 11:687–707.
- Dekker, J. P., & Lau, A. F. (2016). An update on the *Streptococcus bovis* group: classification, identification, and disease associations. *Journal of clinical microbiology* 54(7), 1694-1699.
- Del Rio, B., Linares, D. M., Ladero, V., Redruello, B., Fernández, M., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2015). Putrescine production via the agmatine deiminase pathway increases the growth of *Lactococcus lactis* and causes the alkalization of the culture medium. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(2), 897-905.

- Delorme, C., Abraham, A. L., Renault, P., & Guédon, E. (2015). Genomics of *Streptococcus salivarius*, a major human commensal. *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 381-392.
- Delorme, C., Bartholini, C., Bolotine, A., Ehrlich, S.D., & Renault, P. (2010). Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(2), 451-460.
- Delorme, C., Bartholini, C., Luraschi, M., Pons, N., Loux, V., Almeida, M., Guédon, E., Gibrat, J.-F., & Renault, P. (2011). Complete Genome Sequence of the Pigmented *Streptococcus thermophilus* Strain JIM8232. *Journal of Bacteriology*. 193(19), 5581-5582.
- Delorme, C., Poyart, C., Ehrlich, S.D., & Renault, P. (2007). Extent of Horizontal Gene Transfer in Evolution of Streptococci of the Salivarius Group. *J. Bacteriol.* 189(4), 1330-1341.
- Derouiche Belamri, M. (2017). Lait et produits laitiers : diversification, fréquences et modes de consommation dans la tradition algérienne. *Thèse de doctorat. Sciences alimentaires. Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine 1 (UFMCI)*, 189 p (+annexes).
- Deshpande, G., Athalye-Jape, G., & Patole, S. (2018). Para-probiotics for Preterm Neonates—The Next Frontier. *Nutrients*, 10(7).
- Dong, J., Zhang, Y., & Zhang, H. (2015). Health properties of traditional fermented mongolian milk foods. In: Liang MT. (eds) *Beneficial Microorganisms in Food and Nutraceuticals. Microbiology Monographs*, vol 27. Springer, pp 37-61.
- Doyon M, Jullien C Labrecque J. (2012). Mesure des propensions individuelles à payer pour les aliments fonctionnels : Une approche expérimentale auprès de consommateurs français. *Revue Française d'Économie*, 26(3): 95-119.
- Drouault, S., & Corthier, G. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research*, 32(2), 101-117.
- Duary, R. K., Batish, V. K., & Grover, S. (2012). Relative gene expression of bile salt hydrolase and surface proteins in two putative indigenous *Lactobacillus plantarum* strains under in vitro gut conditions. *Molecular biology reports*, 39(3), 2541-2552.
- Ducarouge, B. (2012). Régulation des systèmes d'adhérence cellulaire par le CRF2: un effecteur du stress dans le tube digestif. *Thèse de doctorat. Neurosciences - neurobiologie, Grenoble*, 470 p.
- Dufour, D., Nicodème, M., Perrin, C., Driou, A., Brusseau, E., Humbert, G., Gaillard, J. L., & Dary, A. (2008). Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. *International journal of food microbiology*, 125(2), 188-196.
- Dumke, J., Hinse, D., Vollmer, T., Knabbe, C., & Dreier, J. (2014). Development and application of a multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. *Journal of clinical microbiology*, 52(7), 2472-2478.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., European Listeria Genome Consortium, Buchrieser, C., Glaser, P., & Cossart, P. (2002). *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Molecular microbiology*, 45(4), 1095-1106.
- Duteurtre, G., Corniaux, C., & Boutonnet, J. P. (2003). Baisse de la consommation des produits laitiers en Afrique subsaharienne: mythe ou réalité?. In: *Dixièmes rencontres autour des recherches sur les ruminants*. INRA, Institut de l'élevage. Paris, 323-326.

- Ebel, B. (2012). *Sélection de bactéries probiotiques et amélioration de la survie et de la fonctionnalité d'une bactérie modèle, Bifidobacterium bifidum, par modification du potentiel d'oxydoréduction par bullage de gaz*. Thèse de doctorat. Sciences de l'alimentation. Microbiologie. Université de Bourgogne, AgroSup Dijon, 205 p.
- Ebringer, L., Ferenčík, M., & Krajčovič, J. (2008). Beneficial health effects of milk and fermented dairy products. *Folia Microbiologica*, 53(5), 378-394.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA-Opinion of the Scientific Committee. *EFSA Journal*, 5(12), 587.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2018). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 8: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2018. *EFSA Journal*, 16(7), e05315.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2010). Scientific Opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia. *EFSA Journal*, 8(9), 1777.
- El Hatmi, H., Jrad, Z., Oussaief, O., Nasri, W., Sbissi, I., Khorchani, T., & Canabady-Rochelle, L. L. (2018). Fermentation of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) milk by *Enterococcus faecium*, *Streptococcus macedonicus* as a potential alternative of fermented cow milk. *LWT*, 90, 373-380.
- El-Sharoud, W. M., Delorme, C., Darwish, M. S., & Renault, P. (2012). Genotyping of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional Egyptian dairy products by sequence analysis of the phosphoserine phosphatase (serB) gene with phenotypic characterizations of the strains. *Journal of applied microbiology*, 112(2), 329-337.
- Enright, M. C., & Spratt, B. G. (1999). Multilocus sequence typing. *Trends in microbiology*, 7(12), 482-487.
- Evivie, S. E., Li, B., Ding, X., Meng, Y., Yu, S., Du, J., Xu, M., Li, W., Jin, D., Huo, G., & Liu, F. (2017). Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* KLDS 3.1003, a strain with high antimicrobial potential against foodborne and vaginal pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1238.

F

- Facklam, R. 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomie and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:613-30.
- Facklam, R. R. (1972). Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Appl. Environ. Microbiol.*, 23(6), 1131-1139.
- Fahy, J. V., & Dickey, B. F. (2010). Airway mucus function and dysfunction. *New England Journal of Medicine*, 363(23), 2233-2247.
- Fang, F., Li, Y., Bumann, M., Raftis, E. J., Casey, P. G., Cooney, J. C., Walsh, M. A., & O'Toole, P. W. (2009). Allelic variation of bile salt hydrolase genes in *Lactobacillus salivarius* does not determine bile resistance levels. *Journal of bacteriology*, 191(18), 5743-5757.
- Fang, S. H., Lai, Y. J., & Chou, C. C. (2013). The susceptibility of *Streptococcus thermophilus* 14085 to organic acid, simulated gastric juice, bile salt and disinfectant as influenced by cold shock treatment. *Food microbiology*, 33(1), 55-60.
- FAO/WHO (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina.

- FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/OMS Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada.
- Farrow, J. A. E., & Collins, M. D. (1984). DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *Microbiology*, 130(2), 357-362.
- FDA (2002) GRN No.49 *Bifidobacterium lactis* strain Bb12 and *Streptococcus thermophilus* strain Th4. GRAS Not Inventory.
- FDA (2012) GRN No.378 Cultured [dairy sources, sugars, wheat, malt, and fruit- and vegetable based sources] fermented by [*Streptococcus thermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* or mixtures of these strains]. GRAS Not Inventory.
- Faure, S., Pubert, C., Rabiller, J., Tailleux, J., & Yvain, A. L. (2013). Que savons-nous des probiotiques?. *Actualités pharmaceutiques*, 52(528), 18-21.
- Fedorová, M., Nemcová, R., Mudroňová, D., Styková, E., Brudňáková, M., & Reiffová, K. (2018). Exopolysaccharides May Increase Gastrointestinal Stress Tolerance of *Lactobacillus reuteri*. *Folia Veterinaria*, 62(4), 24-32.
- Feehily, C., & Karatzas, K. A. G. (2013). Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *Journal of applied microbiology*, 114(1), 11-24.
- Felis, G., Salvetti, E., & Torriani, S. (2015). Systematic of lactic acid bacteria: current status. In: Mozi, F., Raya, R. R., & Vignolo, G. M. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, 2nd edn. Springer, Verlag, 25-32.
- Fernandez, N., Wrzosek, L., Radziwill-Bienkowska, J., Ringot-Destrez, B., Duviau, M. P., Noordine, M. L., Laroute, V., Robert, V., Cherbuy, C., Daveran-Mingot, M. L., Cocaign-Bousquet, M., Léonard, R., Robbe-Masselot, C., Rul, F., Ogier-Denis, E., Thomas, M., & Cocaign-Bousquet, M. (2018). Characterization of mucus-related properties of *Streptococcus thermophilus*: from adhesion to induction. *Frontiers in physiology*, 9, 980.
- Fernandez-Espla, M. D., Garault, P., Monnet, V., & Rul, F. (2000). *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Applied and environmental microbiology*, 66(11), 4772-4778.
- Flórez, A. B., & Mayo, B. (2017). Antibiotic Resistance-Susceptibility Profiles of *Streptococcus thermophilus* Isolated from Raw Milk and Genome Analysis of the Genetic Basis of Acquired Resistances. *Frontiers in microbiology*, 8, 2608.
- Fogh, J., Fogh, J. M., & Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(1), 221-226.
- Fortina, M. G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A., & Manachini, P. L. (2003). Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiology*, 20(4), 397-404.
- Fox, G. C. A., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R. S., Magrum, L. J., Zablén, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B. J., Stahl, D. A., Luehrsen, K. R., Chen, K. N., & Woese, C. R. (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science*, 209(4455), 457-463.
- Fozo, E. M., & Quivey, R. G. (2004a). The fabM gene product of *Streptococcus mutans* is responsible for the synthesis of monounsaturated fatty acids and is necessary for survival at low pH. *Journal of bacteriology*, 186(13), 4152-4158.
- Fozo, E. M., & Quivey, R. G. (2004b). Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(2), 929-936.

- Fozo, E. M., Kajfasz, J. K., & Quivey Jr, R. G. (2004). Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS microbiology letters*, 238(2), 291-295.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., & Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International dairy journal*, 19(1), 3-11.
- Freitas F, Alves VD, Reis MA (2011) Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol* 29(8):388–398.
- Freitas, M., Tavan, E., Cayuela, C., Diop, L., Sapin, C., & Trugnan, G. (2003). Host-pathogens cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biology of the Cell*, 95(8), 503-506.
- Fugl, A., Berhe, T., Kiran, A., Hussain, S., Laursen, M. F., Bahl, M. I., Iain, M., Yonas H., Kim Ib, S., Mituku Eshetu, G., Richard, I., & Egon Bech, E. (2017). Characterisation of lactic acid bacteria in spontaneously fermented camel milk and selection of strains for fermentation of camel milk. *International dairy journal*, 73, 19-24.
- Fusco, V., Quero, G. M., Poltronieri, P., Morea, M., & Baruzzi, F. (2019). Autochthonous and Probiotic Lactic Acid Bacteria Employed for Production of “Advanced Traditional Cheeses”. *Foods*, 8(9), 412.

G

- Gaglio, R., Cruciata, M., Scatassa, M. L., Tolone, M., Mancuso, I., Cardamone, C., Corona, O., Todaro, M., & Settanni, L. (2019). Influence of the early bacterial biofilms developed on vats made with seven wood types on PDO Vastedda della valle del Belice cheese characteristics. *International journal of food microbiology*, 291, 91-103.
- Gaglio, R., Francesca, N., Di Gerlando, R., Cruciata, M., Guarcello, R., Portolano, B., Moschetti, G., & Settanni, L. (2014). Identification, typing and investigation of the dairy characteristics of lactic acid bacteria isolated from “Vastedda della valle del Belice” cheeses. *Dairy Science & Technology*, 94(2), 157-180.
- Gagnon, M., Berner, A. Z., Chervet, N., Chassard, C., & Lacroix, C. (2013). Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. *Journal of microbiological methods*, 94(3), 274-279.
- Galia, W., Jameh, N., Perrin, C., Genay, M., & Dary-Mourot, A. (2016). Acquisition of PrtS in *Streptococcus thermophilus* is not enough in certain strains to achieve rapid milk acidification. *Dairy Science & Technology*, 96(5), 623-636.
- Galia, W., Perrin, C., Genay, M., & Dary, A. (2009). Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *International Dairy Journal*, 19(2), 89-95.
- Gallagher, S. R., & Desjardins, P. R. (2006). Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current protocols in molecular biology*, 76(1), A-3D.
- Gao, X., Wang, F., Zhao, P., Zhang, R., & Zeng, Q. (2019). Effect of heat-killed *Streptococcus thermophilus* on type 2 diabetes rats. *PeerJ*, 7, e7117.
- Garault, P., Letort, C., Juillard, V., Monnet, V., 2000. Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12), 5128-5133.
- García-Cayuela, T., Korany, A. M., Bustos, I., de Cadiñanos, L. P. G., Requena, T., Peláez, C., & Martínez-Cuesta, M. C. (2014). Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International*, 57, 44-50.
- García-Hernández, J., Moreno, Y., Chuan, C., & Hernández, M. (2012). In Vivo Study of the Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CECT 4005T and *Streptococcus thermophilus* CECT 801 by DVC-FISH after Consumption of Fermented Milk. *Journal of food science*, 77(10), M593-M597.

- Garrett, W. S., Gordon, J. I., & Glimcher, L. H. (2010). Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*, 140(6), 859-870.
- Georgalaki, M. D., Sarantinopoulos, P., Ferreira, E. S., De Vuyst, L., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. (2000). Biochemical properties of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Greek Kasser cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 817-825.
- Georgalaki, M. D., Van den Berghe, E., Kritikos, D., Devreese, B., Van Beeumen, J., Kalantzopoulos, G., De Vuyst, L., & Tsakalidou, E. (2002). Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5891-5903.
- Georgalaki, M., Manolopoulou, E., Anastasiou, R., Papadelli, M., & Tsakalidou, E. (2009). Detection of *Streptococcus macedonicus* in Greek cheeses. *International dairy journal*, 19(2), 96-99.
- Georgalaki, M., Papadelli, M., Chassioti, E., Anastasiou, R., Aktypis, A., De Vuyst, L., Van Driessche, G., Devreese, B., & Tsakalidou, E. (2010). Milk protein fragments induce the biosynthesis of macedocin, the lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Applied and environmental microbiology*, 76(4), 1143-1151.
- Georgalaki, M., Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Pot, B., Van Driessche, G., Devreese, B., & Tsakalidou, E. (2013). Macedovicin, the second food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Food microbiology*, 33(1), 124-130.
- Gezginc, Y., Topcal, F., Comertpay, S., & Akyol, I. (2015). Quantitative analysis of the lactic acid and acetaldehyde produced by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* strains isolated from traditional Turkish yogurts using HPLC. *Journal of dairy science*, 98(3), 1426-1434.
- Ghalouni, E., Hassaine, O., & Karam, N. E. (2018). Phenotypic Identification and Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from L'ben, An Algerian Traditional Fermented Cow Milk. *Journal of PurE and aPPLiEd Microbiology*, 12(2), 521-532.
- Ghazi, F., Benmechernene, Z., Kihal, M., & Gurakan, G. C. (2013). The reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles of *Streptococcus thermophilus* strains with XD9, M13 and OPI-02 MOD primers. *African Journal of Biotechnology*, 12(44), 6245-6252.
- Ghazi, F., Kihal, M., Altay, N., & Gürakan, G. C. (2016). Comparison of RAPD-PCR and PFGE analysis for the typing of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional Turkish yogurts. *Annals of microbiology*, 66(3), 1013-1026.
- Gheziel, C., Russo, P., Arena, M. P., Spano, G., Ouzari, H. I., Kheroua, O., Saidi, D., Fiocco, D., Kaddouri, H., & Capozzi, V. (2019). Evaluating the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains from algerian infant feces: towards the design of probiotic starter cultures tailored for developing countries. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(1), 113-123.
- Ghosh, T., Beniwal, A., Semwal, A., & Navani, N. K. (2019). Mechanistic Insights into Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Associated with Ethnic Fermented Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*, 10, 502.
- Giraffa, G., Carminati, D., & Neviani, E. (1997). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection*, 60(6), 732-738.
- Giraffa, G., Paris, A., Valcavi, L., Gatti, M., & Neviani, E. (2001). Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *Journal of applied microbiology*, 91(5), 937-943.

- Glazunova, O. O., Raoult, D., & Roux, V. (2009). Partial sequence comparison of the rpoB, sodA, groEL and gyrB genes within the genus *Streptococcus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(9), 2317-2322.
- Gonfa, A., Fite, A., Urga, K., & Gashe, B. A. (1999). Microbiological aspects of Ergo (Ititu) fermentation. *SINET: Ethiopian Journal of Science*, 22(2), 283-290.
- González-Rodríguez, I., Sánchez, B., Ruiz, L., Turróni, F., Ventura, M., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., & Margolles, A. (2012). Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(11), 3992-3998.
- Grazia, S. E., Sumayyah, S., Haiti, F. S., Sahlan, M., Heng, N. C., & Malik, A. (2017). Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) activity of *Streptococcus macedonicus* MBF10-2 and its synergistic action in combination with antibiotics. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 10(12), 1140-1145.
- Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie, Elsevier Masson*, 137 (1), 165-175.
- Guarcello, R., Carpino, S., Gaglio, R., Pino, A., Rapisarda, T., Caggia, C., Marino G., Randazzo C. L., Settanni L., & Todaro, M. (2016). A large factory-scale application of selected autochthonous lactic acid bacteria for PDO Pecorino Siciliano cheese production. *Food microbiology*, 59, 66-75.
- Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., & Morelli, L. (2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic?. *British Journal of Nutrition*, 93(6), 783-786.
- Gueimonde, M., Garrigues, C., van Sinderen, D., Clara, G., & Margolles, A. (2009). Bile-inducible efflux transporter from *Bifidobacterium longum* NCC2705, conferring bile resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(10), 3153-3160.
- Guerin, J., Burgain, J., Francius, G., El-Kirat-Chatel, S., Beaussart, A., Scher, J., & Gaiani, C. (2018). Adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* GG surface biomolecules to milk proteins. *Food hydrocolloids*, 82, 296-303.
- Guessas, B., & Kihal, M. (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats'milk. *African Journal of Biotechnology*, 3(6), 339-342.
- Guilloard, I., Lim, E. M., Van de Guchte, M., Grimaldi, C., Penaud, S., & Maguin, E. (2004). Tolérance et réponse adaptative au stress acide chez *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Le Lait*, 84(1-2), 1-6.
- Guiraud, J. P. (2003). Microbiologie Alimentaire, *DUNOD; Tec et Doc Lavoisier: Paris*, 652 p.
- Guo, C., & Zhang, L. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics--a review. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 50(12), 1590-1599.
- Guri, A., Gülseren, I., & Corredig, M. (2013). Utilization of solid lipid nanoparticles for enhanced delivery of curcumin in cocultures of HT29-MTX and Caco-2 cells. *Food & function*, 4(9), 1410-1419.
- Gürtler, V., & Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142(1), 3-16.

H

- Habimana, O., Le Goff, C., Juillard, V., Bellon-Fontaine, M. N., Buist, G., Kulakauskas, S., & Briandet, R. (2007). Positive role of cell wall anchored proteinase PrtP in adhesion of lactococci. *BMC microbiology*, 7(1), 36.
- Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Girardet, J. M., Jardin, J., Perrin, C., Dary, A., & Miclo, L. (2013). Hydrolysis of milk-derived bioactive peptides by cell-associated extracellular peptidases of *Streptococcus thermophilus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(22), 9787-9799.

- Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Girardet, J. M., Lecomte, X., Paris, C., Galia, W., Dary, A., & Miclo, L. (2015). New insights into the proteolytic system of *Streptococcus thermophilus*: use of isracidin to characterize cell-associated extracellular peptidase activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(34), 7522-7531.
- Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Lecomte, X., Miclo, L., & Dary-Mouro, A. (2019). The X-prolyl dipeptidyl-peptidase PepX of *Streptococcus thermophilus* initially described as intracellular is also responsible for peptidase extracellular activity. *Journal of dairy science*, 102(1), 113-123.
- Hamama, A., & Bayi, M. (1991). Composition and microbiological profile of two Moroccan traditional dairy products: raib and jben. *International Journal of Dairy Technology*, 44(4), 118-120.
- Hamon, E. (2011). Utilisation de l'analyse protéomique dans la caractérisation des bactéries d'intérêt probiotique. *Thèse de doctorat, Chimie analytique, Strasbourg*, 230 p.
- Hamoudi-Belarbi, L., NOURI, L. H., & Belkacemi, K. (2016). Effectiveness of convective drying to conserve indigenous yeasts with high volatile profile isolated from algerian fermented raw bovine milk (Rayeb). *Food Science and Technology*, 36(3), 476-484.
- Hanna, M. N., Ferguson, R. J., Li, Y. H., & Cvitkovitch, D. G. (2001). *uvrA* Is an Acid-Inducible Gene Involved in the Adaptive Response to Low pH in *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology*, 183(20), 5964-5973.
- Hardie, J. M., and R. A. Whiley. 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 26:IS-US.
- Hardie, J.M. and Whiley, R.A. The genus *Streptococcus*. In Holzappel, W. H. N., & Wood, B. J. (2012). The genera of lactic acid bacteria (Vol. 2). Springer Science & Business Media. 55-125.
- Hartke, A., Bouché, S., Giard, J. C., Benachour, A., Boutibonnes, P., & Auffray, Y. (1996). The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Current microbiology*, 33(3), 194-199.
- Hatmaker, E. A., Riley, L. A., O'Dell, K. B., Papanek, B., Graveley, B. R., Garrett, S. C., Wei, Y., Terns, M. P., & Guss, A. M. (2018). Complete Genome Sequence of Industrial Dairy Strain *Streptococcus thermophilus* DGCC 7710. *Genome announcements*, 6(6), e01587-17.
- He, J., Zhang, F., & Han, Y. (2017). Effect of probiotics on lipid profiles and blood pressure in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis of RCTs. *Medicine*, 96(51).
- Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Gautier, C., Boudebouze, S., Hols, P., Monnet, V., Rul, F., & Maguin, E. (2008). Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics*, 8(20), 4273-4286.
- Higuchi, T., Hayashi, H., & Abe, K. (1997). Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *Journal of bacteriology*, 179(10), 3362-3364.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. j., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506.
- Hill, D., Sugrue, I., Arendt, E., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2017). Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *FI000Research*, 6.
- Hinse, D., Vollmer, T., Erhard, M., Welker, M., Moore, E. R. B., Kleesiek, K., & Dreier, J. (2011). Differentiation of species of the *Streptococcus bovis/equinus*-complex by MALDI-TOF mass spectrometry in comparison to *sodA* sequence analyses. *Systematic and applied microbiology*, 34(1), 52-57.

- Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Ehrlich, S. D., Guédon, E., Monnet, V., Renault, P., & Kleerebezem, M. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS microbiology reviews*, 29(3), 435-463.
- Holz, C., Busjahn, A., Mehling, H., Arya, S., Boettner, M., Habibi, H., & Lang, C. (2015). Significant reduction in *Helicobacter pylori* load in humans with non-viable *Lactobacillus reuteri* DSM17648: a pilot study. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 7(2), 91-100.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition-. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 365s-373s.
- Huang, Y., Wu, F., Wang, X., Sui, Y., Yang, L., & Wang, J. (2013). Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 2816-2825.
- Hubert, A. (2001). « Alimentation et santé : la science et l'imaginaire », *Anthropology of Food*, S1, octobre Regards croisés sur quelques pratiques alimentaires en Europe, <http://aof.revues.org/document1108.html>.

I

- Ingrassia, I., Leplingard, A., & Darfeuille-Michaud, A. (2005). *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(6), 2880-2887.
- Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H., & Mojgani, N. (2014). Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products. *LWT-food Science and Technology*, 58(2), 355-359.
- Islam, K. S., Fukiya, S., Hagio, M., Fujii, N., Ishizuka, S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., & Yokota, A. (2011). Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology*, 141(5), 1773-1781.
- Ivanova, I., Miteva, V., Stefanova, T. S., Pantev, A., Budakov, I., Danova, S., Moncheva, P., Nikolova, I., Dousset, X., & Boyaval, P. (1998). Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *International Journal of Food Microbiology*, 42(3), 147-158.
- Iyer, R., Tomar, S. K., Kapila, S., Mani, J., & Singh, R. (2010a). Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food research international*, 43(1), 103-110.
- Iyer, R., Tomar, S. K., Maheswari, T. U., & Singh, R. (2010b). *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 20(3), 133-141.
- Izquierdo Alegre, E. (2009). Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. *Thèse de doctorat. Chimie analytique Strasbourg*, 230 p.

J

- Jameh, N. (2012). Système protéolytique de surface de " *streptococcus thermophilus* ": variabilité des capacités d'hydrolyse des caséines: caractérisation d'un nouveau système de transport de peptides. *Thèse de doctorat. Sciences agronomiques. Université de Lorraine*, 228 p.
- Jameh, N., Galia, W., Awussi, A. A., Roux, E., Genay, M., Perrin, C., & Dary-Mourot, A. (2016). Characterization of a new peptide transport system in *Streptococcus thermophilus*. *Food Research International*, 86, 34-45.
- Jans, C., Bugnard, J., Njage, P. M. K., Lacroix, C., & Meile, L. (2012). Lactic acid bacteria diversity of African raw and fermented camel milk products reveals a highly competitive, potentially health-threatening predominant microflora. *LWT-Food Science and Technology*, 47(2), 371-379.

- Jans, C., de Wouters, T., Bonfoh, B., Lacroix, C., Kaindi, D. W. M., Anderegg, J., Böck, D., Vitali, S., Schmid, T., Isenring, J., Kurt, F., Kogi-Makau, W., & Meile, L. (2016). Phylogenetic, epidemiological and functional analyses of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex through an overarching MLST scheme. *BMC microbiology*, *16*(1), 117.
- Jans, C., Kaindi, D. W. M., Böck, D., Njage, P. M. K., Kouamé-Sina, S. M., Bonfoh, B., Lacroix, C., & Meile, L. (2013). Prevalence and comparison of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* and *Streptococcus galloyticus* subsp. *macedonicus* in raw and fermented dairy products from East and West Africa. *International journal of food microbiology*, *167*(2), 186-195.
- Jans, C., Meile, L., Kaindi, D. W. M., Kogi-Makau, W., Lamuka, P., Renault, P., Kreikemeyer, B., Lacroix, C., Hattendorf, J., Zinsstag, J., Schelling, E., Fokou, G., & Bonfoh, B. (2017). African fermented dairy products—overview of predominant technologically important microorganisms focusing on African *Streptococcus infantarius* variants and potential future applications for enhanced food safety and security. *International journal of food microbiology*, *250*, 27-36.
- Jans, C., Meile, L., Lacroix, C., & Stevens, M. J. (2015). Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). *Infection, Genetics and Evolution*, *33*, 419-436.
- Johnson, B. R., O'Flaherty, S., Goh, Y. J., Carroll, I., Barrangou, R., & Klaenhammer, T. R. (2017). The S-layer associated serine protease homolog PrtX impacts cell surface-mediated microbe-host interactions of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Frontiers in microbiology*, *8*, 1185.
- Johnson, B., Selle, K., O'Flaherty, S., Goh, Y. J., & Klaenhammer, T. (2013). Identification of extracellular surface-layer associated proteins in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Microbiology*, *159*(Pt 11), 2269.
- Jolley, K. A., Chan, M. S., & Maiden, M. C. (2004). mlstdbNet—distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC bioinformatics*, *5*(1), 86.
- Jones, N., Bohnsack, J. F., Takahashi, S., Oliver, K. A., Chan, M. S., Kunst, F., Glaser, P., Rusniok, C., Crook, D. W. M., Harding, R. M., Bisharat, N., & Spratt B. G. (2003). Multilocus sequence typing system for group B *streptococcus*. *Journal of clinical microbiology*, *41*(6), 2530-2536.
- Jose, N. M., Bunt, C. R., McDowell, A., Chiu, J. Z., & Hussain, M. A. (2017). A study of *Lactobacillus* isolates' adherence to and influence on membrane integrity of human Caco-2 cells. *Journal of dairy science*, *100*(10), 7891-7896.
- Junjua, M., Kechaou, N., Chain, F., Awussi, A. A., Roussel, Y., Perrin, C., Roux, E., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L.G., Le Roux, Y., Chatel, J. M., & Dary-Mourot, A. (2016). A large scale in vitro screening of *Streptococcus thermophilus* strains revealed strains with a high anti-inflammatory potential. *LWT*, *70*, 78-87.

K

- Kacem, M., and Kaid-Harche, M. (2008). Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria. *Grasas y aceites*, *59*(3), 218-224.
- Kajfasz, J. K., & Quivey, R. G. (2011). Responses of lactic acid bacteria to acid stress. *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. Springer, Boston, 23-53.
- Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Grootaert, C., & Van Camp, J. (2015). Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal Caco-2 cells—A review. *International journal of molecular sciences*, *16*(9), 21555-21574.
- Kang, H. J., & Im, S. H. (2015). Probiotics as an immune modulator. *Journal of nutritional science and vitaminology*, *61*(Supplement), S103-S105.

- Kang, K. H., Lee, J. S., Yoo, M., & Jin, I. (2010). The influence of HtrA expression on the growth of *Streptococcus mutans* during acid stress. *Molecules and cells*, 29(3), 297-304.
- Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., Satokari, R., Vesterlund, S., Hendrickx, A. P., Lebeer, S., De Keersmaecker, S. C., Vanderleyden, J., Hämäläinen, T., Laukkanen, S., Salovuori, N., Ritari, J., Alatalo, E., Korpela, R., Mattila-Sandholm, T., Lassig, A., Hatakka, K., Kinnunen, K. T., Karjalainen, H., Saxelin, M., Laakso, K., Surakka, A., Palva, A., Salusjärvi, T., Auvinen, P., & de Vos, W. M., (2009). Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40), 17193-17198.
- Kaur, G., Ali, S. A., Kumar, S., Mohanty, A. K., & Behare, P. (2017). Label-free quantitative proteomic analysis of *Lactobacillus fermentum* NCDC 400 during bile salt exposure. *Journal of proteomics*, 167, 36-45.
- Kawamura, Y., Hou, X.G., Sultana, F., Miura, H., 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(2), 406-408.
- Kebouchi, M. (2017). Caractérisation des propriétés d'adhésion de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 aux cellules épithéliales intestinales: 1. Rôle des protéines de surface dans la résistance aux sels biliaires et dans l'adhésion, 2. Impact de l'adhésion sur l'expression des gènes eucaryotes et bactériens. *Thèse de doctorat. Procédés biotechnologiques et alimentaires. Université de Lorraine*, 261 p.
- Kebouchi, M., Galia, W., Genay, M., Soligot, C., Lecomte, X., Awussi, A. A., Perrin, C., Roux, E., Dary-Mourot, A., & Le Roux, Y. (2016) Implication of sortase-dependent proteins of *Streptococcus thermophilus* in adhesion to human intestinal epithelial cell lines and bile salt tolerance. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(8), 3667-3679.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *ISRN nutrition*, 2013, 481651.
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International journal of Biosciences*, 1(3), 1-13.
- Kigerl, K. A., & Popovich, P. G. (2019). Gut Dysbiosis and Recovery of Function After Spinal Cord Injury. *Oxford Research Encyclopedias, of Neuroscience*, Oxford University Press.
- Kim, G. B., & Lee, B. H. (2005). Biochemical and molecular insights into bile salt hydrolase in the gastrointestinal microflora-a review. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 18(10), 1505-1512.
- Kim, J. E., Eom, H. J., Li, L., Yoo, K. S., & Han, N. S. (2014). Induction of the acid tolerance response in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 by pre-adaptation in acidic condition. *Food Science and Biotechnology*, 23(1), 221-224.
- Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A., & Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 393-409.
- Klijjn, N., Weerkamp, A. H., & De Vos, W. M. (1995). Biosafety assessment of the application of genetically modified *Lactococcus lactis* spp. in the production of fermented milk products. *Systematic and applied microbiology*, 18(4), 486-492.
- Kolling, G. L., Wu, M., Warren, C. A., Durmaz, E., Klaenhammer, T. R., & Guerrant, R. L. (2012). Lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* alters *Clostridium difficile* infection and in vitro Toxin A production. *Gut Microbes*, 3(6), 523-529.
- König, H., & Fröhlich, J. (2009). Lactic acid bacteria. In: König, H., Uden, G., & Fröhlich, J. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Springer, 3-41.

- Koponen J, Laakso K, Koskeniemi K, Kankainen M, Savijoki K, Nyman TA et al (2012) Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J Proteomics* 75(4):1357–1374.
- Kort, R., Westerik, N., Serrano, L. M., Douillard, F. P., Gottstein, W., Mukisa, I. M., Tuijn, C. J., Basten, L., Hafkamp, B., Meijer, W. C., Teusink, B., de Vos, W. M., Reid, G., & Sybesma, W. (2015). A novel consortium of *Lactobacillus rhamnosus* and *Streptococcus thermophilus* for increased access to functional fermented foods. *Microbial cell factories*, 14(1), 195.
- Kostman, J. R., Edlind, T. D., LiPuma, J. J., & Stull, T. L. (1992). Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(8), 2084-2087.
- Kowalczyk, M., Mayo, B., Fernández, M., & Aleksandrak-Piekarczyk, T. (2015). Updates on metabolism in lactic acid bacteria in light of “Omic” technologies. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, In Mozi, F., Raya, R. R., & Vignolo, G. M. *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*, Wiley-Blackwell, pp 1-24.
- Kumar, A., & Kumar, D. (2015). Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. *Anaerobe*, 33, 117-123.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- L**
- Lahtinen, S. J. (2012). Probiotic viability—does it matter?. *Microbial ecology in health and disease*, 23(1), 18567.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & von Wright, A. (2012). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 4th edn, Taylor & Francis, CRC Press .779 p.
- Laiño, J. E., del Valle, M. J., de Giori, G. S., & LeBlanc, J. G. J. (2013). Development of a high folate concentration yogurt naturally bio-enriched using selected lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 54(1), 1-5.
- Laiño, J. E., del Valle, M. J., Hébert, E. M., de Giori, G. S., & LeBlanc, J. G. (2017). Folate production and fol genes expression by the dairy starter culture *Streptococcus thermophilus* CRL803 in free and controlled pH batch fermentations. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 146-150.
- Laiño, J. E., Levit, R., de LeBlanc, A. D. M., de Giori, G. S., & LeBlanc, J. G. (2019). Characterization of folate production and probiotic potential of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* CRL415. *Food microbiology*, 79, 20-26.
- Laiño, J. E., Zelaya, H., del Valle, M. J., de Giori, G. S., & LeBlanc, J. G. (2015). Milk fermented with selected strains of lactic acid bacteria is able to improve folate status of deficient rodents and also prevent folate deficiency. *Journal of Functional Foods*, 17, 22-32.
- Lairini, S., Beqqali, N., Bouslamti, R., Belkhou, R., & Zerrouq, F. (2014). Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 10(4), 267-277.
- Laparra, J. M., & Sanz, Y. (2009). Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology*, 49(6), 695-701.
- Laudanno, O., Vasconcelos, L., Catalana, J., Cesolari, J. A. (2006) Anti-inflammatory effect of bioflora probiotic administered orally or subcutaneously with live or dead bacteria. *Dig Dis Sci* 51, 2180– 2183.
- Le Lay, J. (2014). Compréhension des mécanismes impliqués dans l'activité réductrice et dans les adaptations métaboliques à pH acide de *Bacillus cereus*: implication des thiols exofaciaux. *Thèse de doctorat. Biotechnologie et microbiologie. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon*, 192 p.

- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H. L., Verhoeven, T. L., Marien, E., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A., M. de Vos, W., De Keersmaecker, S. C. J., & Vanderleyden, J. (2012). Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(1), 185-193.
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrière, Y., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2009). Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(11), 3554-3563.
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L., Vélez, M. P., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2007). Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(21), 6768-6775.
- Leivers, S., Hidalgo-Cantabrana, C., Robinson, G., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P., & Laws, A. P. (2011). Structure of the high molecular weight exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA-R1 and sequence analysis of its putative eps cluster. *Carbohydrate research*, 346(17), 2710-2717.
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., & Zweibaum, A. (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer research*, 50(19), 6334-6343.
- Lesuffleur, T., Porchet, N., Aubert, J. P., Swallow, D., Gum, J. R., Kim, Y. S., Real, F.X., & Zweibaum, A. (1993). Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *Journal of Cell Science*, 106(3), 771-783.
- Letort, C., & Juillard, V. (2001). Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of applied microbiology*, 91(6), 1023-1029.
- Li, X., Xing, J., Li, B., Yu, F., Lan, X., & Liu, J. (2013). Phylogenetic analysis reveals the coexistence of interfamily and interspecies horizontal gene transfer in *Streptococcus thermophilus* strains isolated from the same yoghurt. *Molecular phylogenetics and evolution*, 69(1), 286-292.
- Liévin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2013). Pathogenesis of human enterovirulent bacteria: lessons from cultured, fully differentiated human colon cancer cell lines. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 77(3), 380-439.
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., & Cai, Y. (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. In: Zhang, Y., & Cai, Y. *Lactic acid bacteria, Fundamentals and Practice*, Springer, 103-203.
- Liu, M., Siezen, R. J., & Nauta, A. (2009). In silico prediction of horizontal gene transfer events in *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* reveals proto-cooperation in yogurt manufacturing. *Applied and environmental microbiology*, 75(12), 4120-4129.
- Liu, S., Ren, F., Jiang, J., & Zhao, L. (2016). Acid Response of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN68 Is Accompanied by Modification of the Cell Membrane Fatty Acid Composition. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(7), 1190-1197.
- Liu, S., Xiao, C., Peng, C., Liang, L., He, X., Zhao, S., & Zhang, G. (2019). Probiotic strains improve high-fat diet-induced hypercholesterolemia through modulating gut microbiota in ways different from atorvastatin. *Food & function*, 10(9), 6098-6109.
- Lombardi, A., Gatti, M., Rizzotti, L., Torriani, S., Andrighetto, C., & Giraffa, G. (2004). Characterization of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from artisanal Italian raw milk cheeses. *International dairy journal*, 14(11), 967-976.

- Lopez M, Li N, Kataria J, Russell M, Neu J (2008) Live and ultraviolet-inactivated *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease flagellin-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr* 138: 2264–2268
- Lucas, P. M., Blancato, V. S., Claisse, O., Magni, C., Lolkema, J. S., & Lonvaud-Funel, A. (2007). Agmatine deiminase pathway genes in *Lactobacillus brevis* are linked to the tyrosine decarboxylation operon in a putative acid resistance locus. *Microbiology*, 153(7), 2221-2230.
- Lukić, J., Strahinić, I., Jovčić, B., Filipić, B., Topisirović, L., Kojić, M., & Begović, J. (2012). Different roles for lactococcal aggregation factor and mucin binding protein in adhesion to gastrointestinal mucosa. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(22), 7993-8000.
- Lv, L. X., Yan, R., Shi, H. Y., Shi, D., Fang, D. Q., Jiang, H. Y., Wu, W.R., Guo, F.F., Jiang, X.W., Gu, S.L., Chen, Y.B., Yao, J., & Li, L. J. (2017). Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the bile stress response in probiotic *Lactobacillus salivarius* LI01. *Journal of proteomics*, 150, 216-229.

M

- Mackie, A., & Rigby, N. (2015). InfoGest consensus method. *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer, 13-22.
- Maeda, Y., Goldsmit, C. E., Coulter, W. A., Mason, C., Dooley, J. S. G., Lowery, C. J., Millar, B.C., & Moore, J. E. (2011). Comparasion of five gene loci (rnpB, 16S rRNA, 16S-23S rRNA, sodA and dnaJ) to aid the molecular identification of viridans-group streptococci and pneumococci. *British journal of biomedical science*, 68(4), 190-196.
- Maiden, M. C., 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., & Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3140-3145.
- 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, DM, Hawkins, T, Plengvidhya, V, Welker, D, Hughes, J, Goh, Y, Benson, A, Baldwin, K, Lee, JH, 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, & Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15611-15616.
- Maldonado Galdeano, C., Novotny Nunez, I., Carmuega, E., de Moreno de LeBlanc, A., & Perdigon, G. (2015). Role of probiotics and functional foods in health: gut immune stimulation by two probiotic strains and a potential probiotic yoghurt. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 15(1), 37-45.
- Manachini, P. L., Flint, S. H., Ward, L. J. H., Kelly, W., Fortina, M. G., Parini, C., & Mora, D. (2002). Comparison between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus waius* strains and reclassification of *Streptococcus waius* (Flint et al. 1999) as *Streptococcus macedonicus* (Tsakalidou et al. 1998). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(3), 945-951.
- Mantovani, F. D., de Carla Bassetto, M., de Souza, C. H., Aragon, D. C., de Santana, E. H., Pimentel, T. C., & Aragon-Alegro, L. C. (2019). Is there an impact of the dairy matrix on the survival of *Lactobacillus casei* Lc-1 during shelf life and simulated gastrointestinal conditions?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(1), 32-37.

- Maragkoudakis, P. A., Papadelli, M., Georgalaki, M., Panayotopoulou, E. G., Martinez-Gonzalez, B., Mentis, A. F., Petraki, K., Sgouras, D.N., & Tsakalidou, E. (2009). In vitro and in vivo safety evaluation of the bacteriocin producer *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *International journal of food microbiology*, 133(1-2), 141-147.
- Marcial, G., Villena, J., Faller, G., Hensel, A., & de Valdéz, G. F. (2017). Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* CRL1190 reduces the inflammatory response caused by *Helicobacter pylori*. *Beneficial microbes*, 8(3), 451-461.
- Marconi, E., Sorrentino, E., Mastrocola, E et Coppola, R (2000). Rapid detection of diaminopimelic acid in lactic acid bacteria by microwave cell wall hydrolysis. *J. Agric. Chem.* 48, 3348-3351.
- Marshman, E., Booth, C., & Potten, C. S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays*, 24(1), 91-98.
- Marteau, P. (2004). Facteurs de contrôle de la flore. Définitions et mode d'action des probiotiques et prébiotiques In Rambaud J-C., Buts J-P., Corthier G., Flourié B. (eds) Flore microbienne intestinale – physiologie et pathologie digestives, John Libbey Eurotext, Paris, pp 37-57.
- Marteau, P., Flourie, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J. F., & Rambaud, J. C. (1990). Effect of the microbial lactase (EC 3.2. 1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *British Journal of Nutrition*, 64(1), 71-79.
- Marteau, P., & Shanahan, F. (2003). Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 725-740.
- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends in food science & technology*, 30(1), 70-83.
- Martins, M., Porrini, C., Du Merle, L., Danne, C., Robbe-Masselot, C., Trieu-Cuot, P., & Dramsi, S. (2016). The Pil3 pilus of *Streptococcus gallolyticus* binds to intestinal mucins and to fibrinogen. *Gut microbes*, 7(6), 526-532.
- Martirosyan, D. M., & Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? *Functional foods in health and disease*, 5(6), 209-223.
- Mater, D. D., Bretigny, L., Firmesse, O., Flores, M. J., Mogenet, A., Bresson, J. L., & Corthier, G. (2005). *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiology Letters*, 250(2), 185-187.
- Mattarelli, P., Holzapfel, W., Franz, C. M., Endo, A., Felis, G. E., Hammes, W., Pot, B., Dicks, L., & Dellaglio, F. (2014). Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(4), 1434-1451.
- Morelli, L., Callegari, M. L., Vogensen, F. K., & Von Wright, A. (2012). Genetics of lactic acid bacteria. In: Zhang, Y., & Cai, Y. *Lactic acid bacteria, Fundamentals and Practice*, Springer, 17-37.
- McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P., & Florin, T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 265.
- Medjoudj, H., Aouar, L., Zidoune, M. N., & Hayaloglu, A. A. (2017). Proteolysis, microbiology, volatiles and sensory evaluation of Algerian traditional cheese Bouhezza made using goat's raw milk. *International journal of food properties*, 20(sup3), S3246-S3265.
- Ménard, I. (2011). *Une nouvelle méthode d'épidémiologie moléculaire pour le chlamydia trachomatis: le multi locus sequence typing*. Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de maître es sciences en microbiologie Université de Sherbrooke, Québec, Canada, 79p.

- Mende, S., Mentner, C., Thomas, S., Rohm, H., & Jaros, D. (2012). Exopolysaccharide production by three different strains of *S. thermophilus* and its effect on physical properties of acidified milk. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 466-474.
- Mennane, Z., Khedid, K., Zinedine, A., Lagzouli, M., Ouhssine, M., & Elyachioui, M. (2007). Microbial Characteristics of Klila and Jben Traditionnal Moroccan Cheese from Raw Cow's Milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 2(1), 23-27.
- Mermouri, L., Dahmani, M. A., Bouhafoun, A., Berges, T., Kacem, M., & Kaid-Harche, M. (2017). In vitro Screening for Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated from Algerian Fermented Products. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(1), 95-103.
- Merritt, M. E., & Donaldson, J. R. (2009). Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *Journal of medical microbiology*, 58(12), 1533-1541.
- Mezaini, A., Chihib, N. E., Dilmi Bouras, A., Nedjar-Arroume, N., & Hornez, J. P. (2009). Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product. *Journal of environmental and public health*, 678495, 6p.
- Miclo, L., Roux, E., Genay, M., Brusseau, E., Poirson, C., Jameh, N., Perrin, C., & Dary, A. (2012). Variability of hydrolysis of β -, α 1-, and α 2-caseins by 10 strains of *Streptococcus thermophilus* and resulting bioactive peptides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(2), 554-565.
- Moghimpour, E., Ameri, A., & Handali, S. (2015). Absorption-enhancing effects of bile salts. *Molecules*, 20(8), 14451-14473.
- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O., & Yadav, H. (2008). Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of digestive Diseases*, 9(4), 190-198.
- Mollet, C., Drancourt, M., & Raoult, D. (1997). rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular microbiology*, 26(5), 1005-1011.
- Monnet, C., Mora, D., 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.
- Montanari, C., Kamdem, S. L. S., Serrazanetti, D. I., Etoa, F. X., & Guerzoni, M. E. (2010). Synthesis of cyclopropane fatty acids in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus sanfranciscensis* and their cellular fatty acids changes following short term acid and cold stresses. *Food microbiology*, 27(4), 493-502.
- Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(16), 6463-6472.
- Mora, D., Fortina, M. G., Parini, C., Ricci, G., Gatti, M., Giraffa, G., & Manachini, P. L. (2002). Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *Journal of applied microbiology*, 93(2), 278-287.
- Mora, D., Maguin, E., Masiero, M., Parini, C., Ricci, G., Manachini, P. L., & Daffonchio, D. (2004). Characterization of urease genes cluster of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of applied microbiology*, 96(1), 209-219.
- Mora, D., Monnet, C., Parini, C., Guglielmetti, S., Mariani, A., Pintus, P., Molinari, F., Daffonchio, D., & Manachini, P. L. (2005). Urease biogenesis in *Streptococcus thermophilus*. *Research in microbiology*, 156(9), 897-903.

- Mora, D., Ricci, G., Guglielmetti, S., Daffonchio, D., & Fortina, M. G. (2003). 16S–23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in *Streptococcus thermophilus* and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. *Microbiology*, *149*(3), 807-813.
- Morandi, S., & 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., & Coppola, S. (1998). Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, *85*(1), 25-36.

N

- Nejati, F., & Oelschlaeger, T. (2015). In vitro characterization of *Lactococcus lactis* strains isolated from Iranian traditional dairy products as a potential probiotic. *Applied Food Biotechnology*, *3*(1), 43-51.
- Nieto-Arribas, P., Poveda, J. M., Seseña, S., Palop, L., & Cabezas, L. (2009). Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control*, *20*(12), 1092-1098.
- Nyambane, B., Thari, W. M., Wangoh, J., & Njage, P. M. (2014). Lactic acid bacteria and yeasts involved in the fermentation of amabere amaruranu, a Kenyan fermented milk. *Food science & nutrition*, *2*(6), 692-699.

O

- O'Sullivan, O., & Cotter, P. D. (2017). Microbiota of raw milk and raw milk cheeses. *Cheese*, Academic Press, 301-316.
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions—a review. *International Journal of Medical Microbiology*, *300*(1), 57-62.
- Oguntoyinbo, F. A., Turlomousis, P., Gasson, M. J., & Narbad, A. (2011). Analysis of bacterial communities of traditional fermented West African cereal foods using culture independent methods. *International journal of food microbiology*, *145*(1), 205-210.
- Olivares, M., Díaz-Roperro, M. P., Gómez, N., Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Maldonado, J. A., Martí'n, R., Lo'pez-Huertas, E., Rodríguez, J.M., & Xaus, J. (2006). Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, enhances the intestinal function of healthy adults. *International journal of food microbiology*, *107*(2), 104-111.
- Ona-Nguema, G., Roose-Amsaleg, C., Paolozzi, L., Liébart, J.-C., Bauda, P., Bodilis, J., Dussurget, O., Forterre, P., Gutierrez, C., Latifi, A. (2015). *Microbiologie*. DUNOD, Paris.
- Ouadghiri, M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Naser, S., Gevers, D., Lefebvre, K., Swings, J., & Amar, M. (2009). Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk 'lben'. *Journal of applied microbiology*, *106*(2), 486-495.
- Ouwehand, A. C., & Salminen, S. (2003). In vitro adhesion assays for probiotics and their in vivo relevance: a review. *Microbial ecology in health and disease*, *15*(4), 175-184.
- Ouwehand, A. C., Gråsten, S., Niemi, P., Mykkänen, H., & Salminen, S. (2000). Wheat or rye supplemented diets do not affect faecal mucus concentration or the adhesion of probiotic micro-organisms to faecal mucus. *Letters in applied microbiology*, *31*(1), 30-33.
- Oxaran David, V. (2012). Virginie Oxaran David. Caractérisation fonctionnelle des sortases de *Lactococcus lactis* : de l'ancrage de protéines à la biogénèse de pili. *Thèse de doctorat. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI*, 238 p.

P

- Pachekrepapol, U., Lucey, J. A., Gong, Y., Naran, R., & Azadi, P. (2017). Characterization of the chemical structures and physical properties of exopolysaccharides produced by various *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of dairy science*, *100*(5), 3424-3435.
- Pacini, F., Cariolato, D., Andrighetto, C., & Lombardi, A. (2006). Occurrence of *Streptococcus macedonicus* in Italian cheeses. *FEMS microbiology letters*, *261*(1), 69-73.
- Pakdaman, M. N., Udani, J. K., Molina, J. P., & Shahani, M. (2015). The effects of the DDS-1 strain of lactobacillus on symptomatic relief for lactose intolerance-a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial. *Nutrition journal*, *15*(1), 56.
- Papadelli, M., Karsioti, A., Anastasiou, R., Georgalaki, M., & Tsakalidou, E. (2007). Characterization of the gene cluster involved in the biosynthesis of macedocin, the lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus*. *FEMS microbiology letters*, *272*(1), 75-82.
- Papadelli, M., Manolopoulou, E., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. (2003). Rapid detection and identification of *Streptococcus macedonicus* by species-specific PCR and DNA hybridisation. *International journal of food microbiology*, *81*(3), 231-239.
- Papadimitriou, K. (2018). Novel insight into the pathogenicity of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* belonging to the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex. *Virulence*, *9*(1), 662-665.
- Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Mavrogonatou, E., Blom, J., Papandreou, N. C., Hamodrakas, S. J., Ferreira, S., Renault, P., Supply, P., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2014). Comparative genomics of the dairy isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 against related members of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex. *BMC genomics*, *15*(1), 272.
- Papadimitriou, K., Boutou, E., Zoumpopoulou, G., Tarantilis, P. A., Polissiou, M., Vorgias, C. E., & Tsakalidou, E. (2008). RNA arbitrarily primed PCR and fourier transform infrared spectroscopy reveal plasticity in the acid tolerance response of *Streptococcus macedonicus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *74*(19), 6068-6076.
- Papadimitriou, K., Ferreira, S., Papandreou, N. C., Mavrogonatou, E., Supply, P., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2012). Complete genome sequence of the dairy isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *J Bacteriol* *194*, 1838-1839.
- Papadimitriou, K., Mavrogonatou, E., Bolotin, A., Tsakalidou, E., & Renault, P. (2016). Whole-genome sequence of the cheese isolate *Streptococcus macedonicus* 679. *Genome Announc.*, *4*(5), e01025-16.
- Papadimitriou, K., Pratsinis, H., Nebe-von-Caron, G., Kletsas, D., & Tsakalidou, E. (2007). Acid tolerance of *Streptococcus macedonicus* as assessed by flow cytometry and single-cell sorting. *Appl. Environ. Microbiol.*, *73*(2), 465-476.
- Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Folligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2015). Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Frontiers in microbiology*, *6*, 58.
- Papadimitriou, K., Pratsinis, H., Nebe-von-Caron, G., Kletsas, D., & Tsakalidou, E. (2006). Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescence probes. *International journal of food microbiology*, *111*(3), 197-205.
- Parente, E., & Cogan, T. M. (2004). Starter cultures: general aspects. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, *1*, 123-148.
- Park, M. S., Kwon, B., Ku, S., & Ji, G. (2017). The efficacy of *Bifidobacterium longum* BORI and *Lactobacillus acidophilus* AD031 probiotic treatment in infants with rotavirus infection. *Nutrients*, *9*(8), 887.

- Pascal, G., Mareschi, J. P., Contor, L., & Antoine, J. M. (2008). Démonstration scientifique des fonctions des aliments associées à la santé. *Cahiers de Nutrition et de Dietétique*, 43(1), 31-36.
- Pastar, I., Tonic, I., Golic, N., Kojic, M., Van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Topisirovic, L., & Jovanovic, G. (2003). Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(10), 5802-5811.
- Pastink, M. I., Teusink, B., Hols, P., Visser, S., de Vos, W. M., & Hugenholtz, J. (2009). Genome-scale model of *Streptococcus thermophilus* LMG18311 for metabolic comparison of lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 75(11), 3627-3633.
- Patel, A. K., Singhania, R. R., Pandey, A., & Chincholkar, S. B. (2010). Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(1), 166-180.
- Pavón, A. B. I., & Maiden, M. C. (2009). Multilocus sequence typing. *Molecular Epidemiology of Microorganisms*. Humana Press, Totowa, NJ, 129-140.
- Pelaseyed, T., Bergström, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Nyström, E. E., Wising, C., Johansson, M. E., & Hansson, G. C. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological reviews*, 260(1), 8-20.
- Pereira, J. F., Awatade, N. T., Loureiro, C. A., Matos, P., Amaral, M. D., & Jordan, P. (2016). The third dimension: new developments in cell culture models for colorectal research. *Cellular and molecular life sciences*, 73(21), 3971-3989.
- Pernoud, S., Schneid-Citrain, N., Agnetti, V., Breton, S., Faurie, J.M., Marchal, L., Obis, D., Oudot, D., Paquet, D., & Robinson, T. (2005) Application des bactéries lactiques dans les produits laitiers frais et effets des probiotiques. In: Luquet, F.M., & Corrieu, G. (eds) : Bactéries Lactiques et Probiotiques, Tec & Doc, Lavoisier, Paris, pp. 1–106.
- Perreault, N., & Beaulieu, J. F. (1998). Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Experimental cell research*, 245(1), 34-42.
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 141.
- Pfeiler, E. A., & Klaenhammer, T. R. (2009). Role of transporter proteins in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(18), 6013-6016.
- Philipp, B. (2011). Bacterial degradation of bile salts. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(4), 903-915.
- Pieterse, R., Todorov, S. D., & Dicks, L. M. (2008). Bacteriocin ST91KM, produced by *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* ST91KM, is a narrow-spectrum peptide active against bacteria associated with mastitis in dairy cattle. *Canadian journal of microbiology*, 54(7), 525-531.
- Pinto ; M., Robine-Leon, S., Appay, M. D., Kedinger, M., Triadou, N., & Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J., Zweibaum, A. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line caco-2 in culture. *Biol Cell*, 47, 323-330.
- Pitino, I., Randazzo, C. L., Cross, K. L., Parker, M. L., Bisignano, C., Wickham, M. S., Mandalari, G., & Caggia, C. (2012). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. *Food microbiology*, 31(1), 57-63.
- Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*, 10(suppl_1), S49-S66.

- Poyart, C., Quesne, G., Coulon, S., Berche, P., & Trieu-Cuot, P. (1998). Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *Journal of clinical microbiology*, 36(1), 41-47.
- Poyart, C., Quesne, G., & Trieu-Cuot, P. (2002). Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (sodA) sequences: reclassification of *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype 11.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(4), 1247-1255.
- Poznanski, E. L. I. S. A., Cavazza, A., Cappa, F., & Cocconcelli, P. S. (2004). Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *International journal of food microbiology*, 92(2), 141-151.
- Prashant, Tomar, S. K., Singh, R., Gupta, S. C., Arora, D. K., Joshi, B. K., & Kumar, D. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli from Churpi cheese. *Dairy science & technology*, 89(6), 531-540.
- Puri, P., Rattan, A., Bijlani, R. L., Mahapatra, S. C., & Nath, I. (1996). Splenic and intestinal lymphocyte proliferation response in mice fed milk or yogurt and challenged with Salmonella typhimurium. *International journal of food sciences and nutrition*, 47(5), 391-398.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarnier, F., Kristiansen K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J.; MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S.D., & Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59.
- Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., & Girbés, T. (2014). Probiotic lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 5(18), 1765.

R

- Radziwill-Bienkowska, J. M., Robert, V., Drabot, K., Chain, F., Cherbuy, C., Langella, P., Thomas, M., Bardowski, J.K., Mercier-Bonin, M., & Kowalczyk, M. (2017). Contribution of plasmid-encoded peptidase S8 (PrtP) to adhesion and transit in the gut of *Lactococcus lactis* IBB477 strain. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(14), 5709-5721.
- Radziwill-Bienkowska, J. M., Zochowska, D., Bardowski, J., Mercier-Bonin, M., & Kowalczyk, M. (2014). *Lactococcus lactis* IBB477 presenting adhesive and muco-adhesive properties as a candidate carrier strain for oral vaccination against influenza virus. *Acta Biochimica Polonica*, 61(3).
- Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food research international*, 49(2), 619-625.
- Randazzo, C. L., Torriani, S., Akkermans, A. D., de Vos, W. M., & Vaughan, E. E. (2002). Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1882-1892.
- Ranjbar, S., Seyednejad, S. A., Azimi, H., Rezaeizadeh, H., & Rahimi, R. (2019). Emerging Roles of Probiotics in Prevention and Treatment of Breast Cancer: A Comprehensive Review of Their Therapeutic Potential. *Nutrition and cancer*, 71(1), 1-12.

- Rasmussen, T. B., Danielsen, M., Valina, O., Garrigues, C., Johansen, E., & Pedersen, M. B. (2008). *Streptococcus thermophilus* core genome: comparative genome hybridization study of 47 strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(15), 4703-4710.
- Reale, A., Di Renzo, T., Rossi, F., Zotta, T., Iacumin, L., Preziuso, M., Parente, E., Sorrentino, E., & Coppola, R. (2015). Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 721-728.
- Redlingshöfer, B., & Soyeux, A. (2010). Cultures des laits du monde. *Le Courrier de l'environnement de l'INRA*, 59(59), 93-96.
- Renye, J. A., Somkuti, G. A., Garabal, J. I., & Steinberg, D. H. (2016). Bacteriocin production by *Streptococcus thermophilus* in complex growth media. *Biotechnology letters*, 38(11), 1947-1954.
- Reunanen, J., von Ossowski, I., Hendrickx, A. P., Palva, A., & de Vos, W. M. (2012). Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(7), 2337-2344.
- Ridlon, J. M., Harris, S. C., Bhowmik, S., Kang, D. J., & Hylemon, P. B. (2016). Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut microbes*, 7(1), 22-39.
- Ripamonti, B., Agazzi, A., Bersani, C., De Dea, P., Pecorini, C., Pirani, S., Rebucci, R., Savoini, G., Stella, S., Stenico, A., Tirloni, E., & Domeneghini, C. (2011). Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. *Anaerobe*, 17(3), 97-105.
- Rizkalla, S. W., J. Luo, M. Kabir, A. Chevalier, N. Pacher, and G. Slama. 2000. Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breathhydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 1474–1479.
- Rodríguez, C., Medici, M., Mozzi, F., & de Valdez, G. F. (2010). Therapeutic effect of *Streptococcus thermophilus* CRL 1190-fermented milk on chronic gastritis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 16(13), 1622.
- Rodríguez, C., Medici, M., Rodríguez, A. V., Mozzi, F., & de Valdez, G. F. (2009). Prevention of chronic gastritis by fermented milks made with exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of dairy science*, 92(6), 2423-2434.
- Rodríguez-Serrano, G. M., Garcia-Garibay, M., Cruz-Guerrero, A. E., Gómez-Ruiz, L., Ayala-Nino, A., Castaneda-Ovando, A., & González-Olivares, L. G. (2018). Proteolytic system of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(10), 1581-1588.
- Rosell, J. M. (1932). Yoghourt and kefir in their relation to health and therapeutics. *Canadian Medical Association Journal*, 26(3), 341.
- Rossi, F., Marzotto, M., Cremonese, S., Rizzotti, L., & Torriani, S. (2013). Diversity of *Streptococcus thermophilus* in bacteriocin production; inhibitory spectrum and occurrence of thermophilin genes. *Food microbiology*, 35(1), 27-33.
- Rousset, M., Laburthe, M., Pinto, M., Chevalier, G., Rouyer-Fessard, C., Dussaulx, E., Trugnan, G., Boige, N., Brun, J. L., & Zweibaum, A. (1985). Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2: Modulation by forskolin. *Journal of cellular physiology*, 123(3), 377-385.
- Ru, X., Zhang, C. C., Yuan, Y. H., Yue, T. L., & Guo, C. F. (2019). Bile salt hydrolase activity is present in nonintestinal lactic acid bacteria at an intermediate level. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(2), 893-902.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Arigoni, F., Clara, G., & Margolles, A. (2009). Bile affects the synthesis of exopolysaccharides by *Bifidobacterium animalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(4), 1204-1207.

- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M. J., Nevado, F. P., & de Guía Córdoba, M. (2008). Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*, 80(3), 715-721.
- Ruiz, L., Margolles, A., & Sánchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in microbiology*, 4, 396.
- Ruiz, L., Sánchez, B., Ruas-Madiedo, P., De Los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. (2007). Cell envelope changes in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* as a response to bile. *FEMS microbiology letters*, 274(2), 316-322.
- Rul, F., Ben-Yahia, L., Chegiani, F., Wrzosek, L., Thomas, S., Noordine, M. L., Gitton, C., Cherbuy, C., Langella, P., & Thomas, M. (2011). Impact of the metabolic activity of *Streptococcus thermophilus* on the colon epithelium of gnotobiotic rats. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10288-10296.
- Ruppitsch, W. (2016). Molecular typing of bacteria for epidemiological surveillance and outbreak investigation/Molekulare Typisierung von Bakterien für die epidemiologische Überwachung und Ausbruchsabklärung. *Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment*, 67(4), 199-224.

S

- Saavedra, J. M., Bauman, N. A., Perman, J. A., Yolken, R. H., & Oung, I. (1994). Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *The lancet*, 344(8929), 1046-1049.
- Salameh, C., Banon, S., Hosri, C., & Scher, J. (2016). An overview of recent studies on the main traditional fermented milks and white cheeses in the Mediterranean region. *Food Reviews International*, 32(3), 256-279.
- Samet-Bali, O., & Attia, H. (2012). Characterization of typical Tunisian fermented milk, Rayeb. *African Journal of Biotechnology*, 11(25), 6744-6749.
- Sánchez, B. (2018). Bile acid–microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis: a role for bifidobacteria and lactobacilli?. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 15(4), 205.
- Sánchez, B., Champomier-Vergès, M. C., Stuer-Lauridsen, B., Ruas-Madiedo, P., Anglade, P., Baraige, F., Reyes-Gavila, C. G., Johansen, E., Zagorec, M., & Margolles, A. (2007). Adaptation and response of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to bile: a proteomic and physiological approach. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(21), 6757-6767.
- Sánchez, B., De Los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. (2006). The F1F0-ATPase of *Bifidobacterium animalis* is involved in bile tolerance. *Environmental Microbiology*, 8(10), 1825-1833.
- Sánchez, B., Ruiz, L., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P., & Margolles, A. (2013). Adaptation of bifidobacteria to the gastrointestinal tract and functional consequences. *Pharmacological research*, 69(1), 127-136.
- Sanders, J. W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J. R., Venema, G., & Kok, J. (1998). A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Molecular microbiology*, 27(2), 299-310.
- Sanders, M. E., & Marco, M. L. (2009). Food formats for effective delivery of probiotics. *Ann Rev Food Sci Technol*, 1, 65-85.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Sarao, L. K., & Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(2), 344-371.
- Sasaki, Y., Horiuchi, H., Kawashima, H., Mukai, T., & Yamamoto, Y. (2014). NADH Oxidase of *Streptococcus thermophilus* 1131 is Required for the Effective Yogurt Fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038. *Bioscience of microbiota, food and health*, 33(1), 31-40.

- Saunders, G. C., Dukes, J., Parkes, H. C., & Cornett, J. H. (2001). Interlaboratory study on thermal cyclers performance in controlled PCR and random amplified polymorphic DNA analyses. *Clinical chemistry*, 47(1), 47-55.
- Savadogo, A., & Traore, A. S. (2011). La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(5), 2057-2075.
- Savaiano, D. A. (2014). Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance. *The American journal of clinical nutrition*, 99(5), 1251S-1255S.
- Schillinger, U., Guigas, C., & Holzapfel, W. H. (2005). In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, 15(12), 1289-1297.
- Schlegel, L., Grimont, F., Ageron, E., Grimont, P. A., & Bouvet, A. (2003). Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 631-645.
- Schleifer, K. H., Ehrmann, M., Krusch, U., & Neve, H. (1991). Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev. *Systematic and applied microbiology*, 14(4), 386-388.
- Schleifer, K. H., & Kilpper-Balz, R. (1987). Molecular approach to the classification of *streptococci*, *enterococci* and *lactococci*. *Systematic and Applied Microbiology*, 10, 1-19.
- Schoustra, S. E., Kasase, C., Toarta, C., Kassen, R., & Poulain, A. J. (2013). Microbial community structure of three traditional zambian fermented products: mabisi, chibwantu and munkoyo. *PLoS one*, 8(5), e63948.
- Scoville, D. H., Sato, T., He, X. C., & Li, L. (2008). Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology*, 134(3), 849-864.
- Senok, A. C., Ismaeel, A. Y., & Botta, G. A. (2005). Probiotics: facts and myths. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(12), 958-966.
- Serrazanetti, D. I., Guerzoni, M. E., Corsetti, A., & Vogel, R. (2009). Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food microbiology*, 26(7), 700-711.
- Settanni, L., Franciosi, E., Cavazza, A., Cocconcelli, P. S., & Poznanski, E. (2011). Extension of Tosèla cheese shelf-life using non-starter lactic acid bacteria. *Food microbiology*, 28(5), 883-890.
- Shahbal, S., Hemme, D., & Desmazeaud, M. (1991). High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Le Lait*, 71(3), 351-357.
- Shibata, Y., Nomoto, R., & Osawa, R. (2014). Development of a multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus gallolyticus*. *Microbiology*, 160(1), 113-122.
- Sicard, J. F., Le Bihan, G., Vogelee, P., Jacques, M., and Harel, J. (2017). Interactions of intestinal bacteria with components of the intestinal mucus. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:387.
- Skorić, M., Šiler, B., Banjanac, T., Živković-Nestorović, J., Dmitrović, S., Mišić, D., & Grubišić, D. (2012). The reproducibility of RAPD profiles: effects of PCR components on RAPD analysis of four *Centaurium* species. *Archives of Biological Sciences*, 64(1), 191-199.
- Slater, S. C., Beachley, V., Hayes, T., Zhang, D., Welsh, G. I., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Wen, X., Su, B., & Satchell, S. C. (2011). An in vitro model of the glomerular capillary wall using electrospun collagen nanofibres in a bioartificial composite basement membrane. *PLoS one*, 6(6), e20802.
- Slattery, C., Cotter, P. D., & O'Toole, P. W. (2019). Analysis of Health Benefits Conferred by *Lactobacillus* Species from Kefir. *Nutrients*, 11(6), 1252.

- Spanhaak, S., Havenaar, R., & Schaafsma, G. (1998). The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52(12), 899.
- Stephens, J., & Turner, D. P. 2015 *Streptococcus thermophilus* bacteraemia in a patient with transient bowel ischaemia secondary to polycythaemia. *JMM Case Reports*. ISSN 2053-3721.
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36(1), 1-29.
- Su, M. S., Schlicht, S., & Gänzle, M. G. (2011). Contribution of glutamate decarboxylase in *Lactobacillus reuteri* to acid resistance and persistence in sourdough fermentation. *Microb Cell Fact* 10(Suppl. 1): S8.
- Sugahara, H., Yao, R., Odamaki, T., & Xiao, J. Z. (2017). Differences between live and heat-killed bifidobacteria in the regulation of immune function and the intestinal environment. *Beneficial microbes*, 8(3), 463-472.
- Sugimoto, S., Higashi, C., Matsumoto, S., & Sonomoto, K. (2010). Improvement of multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 under conditions of thermal stress by heterologous expression of *Escherichia coli* dnaK. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(13), 4277-4285.
- Sun, Z., Chen, X., Wang, J., Zhao, W., Shao, Y., Wu, L., Zhou, Z., Sun, T., Wang, L., Meng, H., Zhang, H., & Chen, W., (2011). Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* strain ND03. *J. Bacteriol.* 193(3), 793-794.
- Sun, Z., Yu, J., Dan, T., Zhang, W., & Zhang, H. (2014). Phylogenesis and evolution of lactic acid bacteria. In: Hang, H., & Cai, Y. Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice. *Springer Dordrecht*, 1-101.
- Šušković, J., Kos, B., Matošić, S., & Besendorfer, V. (2000). The effect of bile salts on survival and morphology of a potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(7), 673-678.
- Suzuki, S., Kimoto-Nira, H., Suganuma, H., Suzuki, C., Saito, T., & Yajima, N. (2014). Cellular fatty acid composition and exopolysaccharide contribute to bile tolerance in *Lactobacillus brevis* strains isolated from fermented Japanese pickles. *Canadian journal of microbiology*, 60(4), 183-191.
- Syngai, G. G., Gopi, R., Bharali, R., Dey, S., Lakshmanan, G. A., & Ahmed, G. (2016). Probiotics-the versatile functional food ingredients. *Journal of food science and technology*, 53(2), 921-933.

T

- Tabrejee, S., Chowdhury, M. M. K., Bari, L., & Yeasmin, S. (2018). Isolation and Characterization of Enterococci from Yoghurts of Bangladesh. *Modern Care Journal*, 15(3), e74460.
- Tagg, J. R., Wescombe, P. A., & Burton, J. P. (2012). *Streptococcus*: A Brief Update on the Current Taxonomic Status of the Genus *in* Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Von Wright, A. (eds). Lactic Acid Bacteria- Microbiological and Functional Aspects, 4th Edn. Boca Raton, FL: CRC Press (Taylor and Francis Group), pp 123-146.
- Tamime, A. Y. (2003). Fermented milks: a historical food with modern applications—a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(S4), S2.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512-526.
- Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T., & Mierau, I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal of dairy science*, 82(12), 2530-2535.

- Taranto, M. P., Perez-Martinez, G., & de Valdez, G. F. (2006). Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Research in microbiology*, 157(8), 720-725.
- Tarrah, A., Da Silva Duarte, V., Pakroo, S., Corich, V., & Giacomini, A. (2020). Genomic and phenotypic assessments of safety and probiotic properties of *Streptococcus macedonicus* strains of dairy origin. *Food Research International*, 130, 108931.
- Tarrah, A., Noal, V., Giaretta, S., Treu, L., da Silva Duarte, V., Corich, V., & Giacomini, A. (2018a). Effect of different initial pH on the growth of *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* strains. *International Dairy Journal*, 86, 65-68. taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36(1), 1-29.
- Tarrah, A., Treu, L., Giaretta, S., Duarte, V., Corich, V., & Giacomini, A. (2018b). Differences in carbohydrates utilization and antibiotic resistance between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products in Italy. *Current microbiology*, 75(10), 1334-1344.
- Taverniti, V., & Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & nutrition*, 6(3), 261.
- Terzaghi, B. E., & Sandine, W. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 29(6), 807-813.
- Thierry, A., Pogačić, T., Weber, M., & Lortal, S. (2015). Production of flavor compounds by lactic acid bacteria in fermented foods. In Mozi, F., Raya, R. R., & Vignolo, G. M. *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*, 2nd edn. Wiley-Blackwell, pp 314-340.
- Thirabunyanon, M., Boonprasom, P., & Niamsup, P. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnology letters*, 31(4), 571-576.
- Thomas, M., Wrzosek, L., Ben-Yahia, L., Noordine, M. L., Gitton, C., Chevret, D., Langella, P., Mayeur, C., Cherbuy, C., & Rul, F. (2011). Carbohydrate metabolism is essential for the colonization of *Streptococcus thermophilus* in the digestive tract of gnotobiotic rats. *PloS one*, 6(12), e28789.
- Thornton, D. J., Rousseau, K., & McGuckin, M. A. (2008). Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu. Rev. Physiol.*, 70, 459-486.
- Tian, F., Yu, L., Zhai, Q., Xiao, Y., Shi, Y., Jiang, J., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2017). The therapeutic protection of a living and dead *Lactobacillus* strain against aluminum-induced brain and liver injuries in C57BL/6 mice. *PloS one*, 12(4), e0175398.
- Tian, H., Tan, J., Zhang, L., Gu, X., Xu, W., Guo, X., & Luo, Y. (2012). Increase of stress resistance in *Lactococcus lactis* via a novel food-grade vector expressing a shsp gene from *Streptococcus thermophilus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1157-1164.
- To, T. M. H., Grandvalet, C., & Tourdot-Maréchal, R. (2011). Cyclopropanation of membrane unsaturated fatty acids is not essential to the acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(10), 3327-3334.
- Trastoy, R., Manso, T., Fernandez-Garcia, L., Blasco, L., Ambroa, A., Del Molino, M. P., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T. K., & Tomas, M. (2018). Mechanisms of bacterial tolerance and persistence in the gastrointestinal and respiratory environments. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00023-18.
- Treu, L., de Diego-Díaz, B., Papadimitriou, K., Tsakalidou, E., Giacomini, A., & Corich, V. (2017). Whole-genome sequences of three *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Italian cheeses in the Veneto region. *Genome Announc.*, 5(50), e01358-17.

- Trip, H., Mulder, N. L., & Lolkema, J. S. (2012). Improved acid stress survival of *Lactococcus lactis* expressing the histidine decarboxylation pathway of *Streptococcus thermophilus* CHCC1524. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 11195-11204.
- Tsakalidou E. (2011). Microbial flora. In: Nollet, L. M. L., and Toldrá, F. Safety analysis of foods of animal origin Part III: Milk and dairy foods, Boca Raton: CRC, 781-98.
- Tsakalidou, E., Manolopoulou, E., Kabaraki, E., Zoidou, E., Pot, B., Kersters, K., & Kalantzopoulos, G. (1994). The combined use of whole-cell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 17(3), 444-458.
- Tsakalidou, E., Zoidou, E., Pot, B., Wassill, L., Ludwig, W., Devriese, L. A., Kalantzopoulos, G., Schleifer, KH., & Kersters, K. (1998). Identification of streptococci from Greek Kasserli cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2), 519-527.
- Tu, Q. V., McGuckin, M. A., & Mendz, G. L. (2008). *Campylobacter jejuni* response to human mucin MUC2: modulation of colonization and pathogenicity determinants. *Journal of medical microbiology*, 57(7), 795-802.

U

- Uriot, O., Denis, S., Junjua, M., Roussel, Y., Dary-Mourot, A., & Blanquet-Diot, S. (2017). *Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate?. *Journal of functional foods*, 37, 74-89.
- Uriot, O., Galia, W., Awussi, A. A., Perrin, C., Denis, S., Chalancon, S., Lorson, E., Poirson, C., Junjua, M., Le Roux, Y., Alric, M., Dary, A., Blanquet-Diot, S., & Roussel, Y. (2016). Use of the dynamic gastro-intestinal model TIM to explore the survival of the yogurt bacterium *Streptococcus thermophilus* and the metabolic activities induced in the simulated human gut. *Food microbiology*, 53, 18-29.
- Uroić, K., Novak, J., Hynönen, U., Pietilä, T. E., Pavunc, A. L., Kant, R., Kos B, Palva A, & Šušković, J. (2016). The role of S-layer in adhesive and immunomodulating properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 623-632.
- Urshev, Z., Ninova-Nikolova, N., Ishlimova, D., Pashova-Baltova, K., Michaylova, M., & Savova, T. (2014). Selection and characterization of naturally occurring high acidification rate *Streptococcus thermophilus* strains. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(5), 899-903.
- Urwin, R., & Maiden, M. C. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in microbiology*, 11(10), 479-487.

V

- Vaillancourt, K., Bédard, N., Bart, C., Tessier, M., Robitaille, G., Turgeon, N., Frenette, M., Moineau, S., & Vadeboncoeur, C. (2008). Role of galK and galM in galactose metabolism by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(4), 1264-1267.
- Vaillancourt, K., LeMay, J. D., Lamoureux, M., Frenette, M., Moineau, S., & Vadeboncoeur, C. (2004). Characterization of a galactokinase-positive recombinant strain of *Streptococcus thermophilus*. *Applied and environmental microbiology*, 70(8), 4596-4603.
- van Belkum, A., Kluytmans, J., van Leeuwen, W., Bax, R., Quint, W., Peters, P., Fluit, A., Vandenbroucke-Grauls, C., van den Brule, A., & Koeleman, H. (1995). Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(6), 1537-1547.

- Van De Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 187-216.
- Van de Water, J., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (1999). The influence of chronic yogurt consumption on immunity. *The Journal of nutrition*, 129(7), 1492-1495.
- Van den Berghe, E., Skourtas, G., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 produces the lantibiotic, macedocin, at temperature and pH conditions that prevail during cheese manufacture. *International journal of food microbiology*, 107(2), 138-147.
- Van der Veen, S., & Abee, T. (2011). Contribution of *Listeria monocytogenes* RecA to acid and bile survival and invasion of human intestinal Caco-2 cells. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(4), 334-340.
- Van Tassell, M. L., & Miller, M. J. (2011). *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*, 3(5), 613-636.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 60(2), 407-438.
- Vanechoutte, M. (1996). DNA fingerprinting techniques for microorganisms. *Molecular biotechnology*, 6(2), 115-142.
- Van De Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 187-216.
- Velcich, A., Palumbo, L., Jarry, A., Laboisse, C., Racevskis, J., & Augenlicht, L. (1995). Patterns of expression of lineage-specific markers during the in vitro-induced differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 6(6), 749-757.
- Vélez, M. P., De Keersmaecker, S. C., & Vanderleyden, J. (2007a). Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS microbiology letters*, 276(2), 140-148.
- Vélez, M. P., Verhoeven, T. L., Draing, C., Von Aulock, S., Pfitzenmaier, M., Geyer, A., Lambrichts, I., Grangette, C., Pot, B., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2007b). Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(11), 3595-3604.
- Veljović, K., Dinić, M., Lukić, J., Mihajlović, S., Tolinački, M., Živković, M., Begović, J., Mrvaljević, I., Golić, N., & Terzić-Vidojević, A. (2017). Promotion of early gut colonization by probiotic intervention on microbiota diversity in pregnant sows. *Frontiers in microbiology*, 8, 2028.
- Vendramin, V., Treu, L., Bovo, B., Campanaro, S., Corich, V., & Giacomini, A. (2014). Whole-genome sequence of *Streptococcus macedonicus* strain 33MO, isolated from the curd of Morlacco cheese in the Veneto region (Italy). *Genome Announc.*, 2(4), e00746-14.
- Vendramin, V., Treu, L., Campanaro, S., Lombardi, A., Corich, V., & Giacomini, A. (2017). Genome comparison and physiological characterization of eight *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian dairy products. *Food microbiology*, 63, 47-57.
- Verruck, S., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Silva, R., Esmerino, E. A., Pimentel, T. C., Freitas, M. Q., Silva, M. C., & Prudencio, E. S. (2019). Dairy foods and positive impact on the consumer's health. *Adv. Food Nutr. Res*, 89, 95-164.
- Vidhyasagar, V., & Jeevaratnam, K. (2013). Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 235-243.
- Vincent, S. J., Faber, E. J., Neeser, J. R., Stinglele, F., & Kamerling, J. P. (2001). Structure and properties of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus macedonicus* Sc136. *Glycobiology*, 11(2), 131-139.
- Von Wright, A., & Axelsson, L. (2012). "Lactic Acid Bacteria: An Introduction," In: Lahtinne, S., Salminen, S., Von Wright, A., & Ouwehand, A. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, CRC Press, London, pp 1-17.

Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman W. B. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes, 2nd edn. Springer, Verlag.*

W

- Walter, J., & Ley, R. (2011). The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annual review of microbiology*, 65, 411-429.
- Walter, J., Loach, D. M., Alqumber, M., Rockel, C., Hermann, C., Pfitzenmaier, M., & Tannock, G. W. (2007). d-Alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environmental microbiology*, 9(7), 1750-1760.
- Wang, C., Cui, Y., & Qu, X. (2018). Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Archives of microbiology*, 200(2), 195-201.
- Wang, R., Jiang, L., Zhang, M., Zhao, L., Hao, Y., Guo, H., Sang, Y., Zhang, H., & Ren, F. (2017). The Adhesion of *Lactobacillus salivarius* REN to a Human intestinal epithelial cell line requires S-layer proteins. *Scientific reports*, 7, 44029.
- Wang, T., Xu, Z., Lu, S., Xin, M., & Kong, J. (2016). Effects of glutathione on acid stress resistance and symbiosis between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *International Dairy Journal*, 61, 22-28.
- Wang, Y., Lee, S. M., & Dykes, G. (2015). The physicochemical process of bacterial attachment to abiotic surfaces: Challenges for mechanistic studies, predictability and the development of control strategies. *Critical reviews in microbiology*, 41(4), 452-464.
- Weidmann, S., Maitre, M., Laurent, J., Coucheney, F., Rieu, A., & Guzzo, J. (2017). Production of the small heat shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* in *Lactococcus lactis* improves its stress tolerance. *International journal of food microbiology*, 247, 18-23.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
- Wilson, R. T. (2017). Traditional milk processing and value-added dairy products in selected Arab countries. *International Journal of Dairy Technology*, 70(3), 307-319.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221.
- Wszolek, M., Kupiec-Teahan, B., Guldager, H. S., & Tamime, A. Y. (2006). Production of kefir, koumiss and other related products. In: Tamime, AY (ed.), *Fermented Milk* Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, pp 174-216.
- Wu, C., He, G., & Zhang, J. (2014a). Physiological and proteomic analysis of *Lactobacillus casei* in response to acid adaptation. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 41(10), 1533-1540.
- Wu, C., Huang, J., & Zhou, R. (2014b). Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(3), 1055-1063.
- Wu, C., Huang, J., & Zhou, R. (2017). Genomics of lactic acid bacteria: current status and potential applications. *Critical reviews in microbiology*, 43(4), 393-404.
- Wu, C., Zhang, J., Chen, W., Wang, M., Du, G., & Chen, J. (2012a). A combined physiological and proteomic approach to reveal lactic-acid-induced alterations in *Lactobacillus casei* Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(2), 707-722.

- Wu, C., Zhang, J., Wang, M., Du, G., & Chen, J. (2012b). *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(7), 1031-1039.
- Wu, R., Sun, Z., Wu, J., Meng, H., & Zhang, H. (2010). Effect of bile salts stress on protein synthesis of *Lactobacillus casei* Zhang revealed by 2-dimensional gel electrophoresis. *Journal of dairy science*, 93(8), 3858-3868.
- Wullschleger, S. M. (2009). Biodiversity and microbial safety of artisanal Malian sour milk fènè and development of adapted starter cultures for controlled production. *Thèse de doctorat en science. ETH Zurich*, 156 p.

X

- Xu, H., Sun, Z., Liu, W., Yu, J., Song, Y., Lv, Q., Zhang, J., Shao, Y., Menghe, B., & Zhang, H. (2014). Multilocus sequence typing of *Lactococcus lactis* from naturally fermented milk foods in ethnic minority areas of China. *Journal of dairy science*, 97(5), 2633-2645.

Y

- Yamamoto, N., Masujima, Y., & Takano, T. (1996). Reduction of membrane-bound ATPase activity in a *Lactobacillus helveticus* strain with slower growth at low pH. *FEMS microbiology letters*, 138(2-3), 179-184.
- Yang, C. L., Wu, X. P., Chen, B., Deng, S. S., Chen, Z. E., Huang, Y. Y., & Jin, S. S. (2017). Comparative analysis of genetic polymorphisms among *Monascus* strains by ISSR and RAPD markers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(2), 636-640.
- Yin, S. D. (2014). Bacteria, viruses, membrane-enclosed microentities and fungi as the environmental evolutionary entities coexisting in non-human mammalian milk. *The Journal of Theoretical Fimpology*, 2 (2): e-20120719-2-2-12.
- Yu, J., Sun, Z., Liu, W., Xi, X., Song, Y., Xu, H., Lv, Q., Bao, Q., Menghe, B., & Sun, T. (2015). Multilocus sequence typing of *Streptococcus thermophilus* from naturally fermented dairy foods in China and Mongolia. *BMC microbiology*, 15(1), 236.
- Yu, J., Wang, W. H., Menghe, B. L. G., Jiri, M. T., Wang, H. M., Liu, W. J., Bao, Q. H., Lu, Q., Zhang, J. C., Wang F., Xu H.Y., Sun, T. S., & Zhang, H. P. (2011). Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. *Journal of dairy science*, 94(7), 3229-3241.

Z

- Zhang, Y. M., & Rock, C. O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 222.
- Ziar, H., Gérard, P., & Riazi, A. (2014). Effect of prebiotic carbohydrates on growth, bile survival and cholesterol uptake abilities of dairy-related bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1184-1190.
- Ziarno, M. (2010). Viability and cholesterol uptake by *Streptococcus thermophilus* cultures in artificial gut fluids. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9(1), 83-94.
- Zitoun, O. A., Benatallah, L., Ghennam, E., & Zidoune, M. N. (2011). Manufacture and characteristics of the traditional Algerian ripened bouhezza cheese. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9(2 part 1), 96-100.
- Zitoun, O. A., Pediliggieri, C., Benatallah, L., Lortal, S., Licitra, G., Zidoune, M. N., & Carpino, S. (2012). Bouhezza, a traditional Algerian raw milk cheese, made and ripened in goatskin bags. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10(2), 289-295.
- ZMR, H., BAM, E., MNI, M., NF, T., & AMM, M. (2016). Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Dairy Product. *Food Science*, 2, 1.
- Zotta, T., Ricciardi, A., Ciocia, F., Rossano, R., & Parente, E. (2008). Diversity of stress responses in dairy thermophilic streptococci. *International journal of food microbiology*, 124(1), 34-42.

- Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Granette, C., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2008). *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *International journal of food microbiology*, 121(1), 18-26.
- Zoumpopoulou, G., Pepelassi, E., Papaioannou, W., Georgalaki, M., Maragkoudakis, P. A., Tarantilis, P., Polissiou, M., Tsakalidou, E & Papadimitriou, K. (2013). Incidence of bacteriocins produced by food-related lactic acid bacteria active towards oral pathogens. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 4640-4654.
- Zoumpopoulou, G., Tzouvanou, A., Mavrogonatou, E., Alexandraki, V., Georgalaki, M., Anastasiou, R., Papadelli, M., Manolopoulou, E., Kazou, M., Kletsas, D., Papadimitriou K., & Tsakalidou, E. (2018). Probiotic features of lactic acid bacteria isolated from a diverse pool of traditional Greek dairy products regarding specific strain-host interactions. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(2), 313-322.
- Zucco, F., Batto, A. F., Bises, G., Chambaz, J., Chiusolo, A., Consalvo, R., Cross, H. S., Dal Negro, G., de Angelis, I., Fabre, G., Guillou, F., Hoffman, S., Laplanche, L., Morel, E., Pinçon-Raymond, M., Prieto, P., Turco, L., Ranaldi, G., Rousset, M., Sambuy, Y., Scarino, M. L., Torreilles, F., & Stamatou A. (2005). An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines. *Alternatives to laboratory animals*, 33(6), 603-618.
- <https://www.alamyimages.fr/photo-image-egypte-bovins-c-b-2300-nmilking-les-vaches-la-peinture-tombe-egyptienne-2300-c-b>. (Consulté le 02. 04. 2019)
- http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/module_Physiologie_58.html (Consulté le 20.03.2020)

Annexes

Annexe 01. Composition des milieux de culture

Milieu	Constituant	Concentration g/L
Lait reconstitué Stérilisation 15 min à 110°C	Lait en poudre écrémé	100
Lait enrichi en bacto-tryptone Stérilisation 15 min à 110°C	Lait en poudre écrémé	100
	Bacto-tryptone	10
LM17 Stérilisation 20 min à 120°C	Bacto-tryptone	2,5
	Extrait de levure	2,5
	Sulfate de magnésium	0,25
	Acide ascorbique	0,5
	Extrait de viande	3
	Soyase	5
	Bacto-peptone	2,5
	β -glycérophosphate de sodium	19
	Lactose	20
Agar (milieu solide)	15	
Bile esculine azide (BEA) Stérilisation 20 min à 120°C	Extrait de viande	3
	Peptone	17
	Extrait de levure	5
	Citrate de sodium	1
	Citrate de fer	0,5
	Chlorure de sodium	5
	Esculine	1
	Bile de bœuf	10
	Azide de sodium	0,25
Agar	13	

Annexe 02. Coloration de Gram

La coloration de Gram est une technique basée sur la différence de composition de la paroi bactérienne. Elle permet de distinguer par microscopie suite à l'action successive de colorants, les bactéries dites à coloration Gram positive (paroi riche en peptidoglycane) de celles à coloration Gram négative (paroi pauvre en peptidoglycane) (Guiraud, 2003).

La technique est effectuée selon les étapes suivantes :

- Réaliser un frottis et le fixer ;
- Recouvrir la lame de violet de gentiane, 1 à 2 minutes ;
- Rincer à l'eau distillée ;
- Recouvrir la lame de lugol, 1 minute ;
- Rincer à l'eau distillée ;
- Décolorer dix secondes à l'alcool ;
- Rincer immédiatement à l'eau distillée ;
- Recouvrir la lame de safranine (ou fuchsine), 1 minute ;
- Rincer à l'eau distillée ;
- Sécher la lame entre 2 feuilles de papier Joseph ;
- Observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile et à pleine lumière.

Résumés

الهدف من هذا العمل هو انتقاء سلالات جديدة غير-ممرضة من نوعي البكتيريا العقدية ستريبتوكوكوس ثيرموفيلوس و ستريبتوكوكوس ماسيدونيكوس من خلال عزلها عن عينات من مشتقات الحليب التقليدية (لبن، رايب) ثم وصف بعض من خصائصها كمعينات حيوية (القدرة على مقاومة وسائط محاكية لظروف السبيل المعدي المعوي والقدرة على الالتصاق بالخلايا الظهارية المعوية في المختبر).

تتألف المنهجية التي تم استعمالها خلال هذا العمل من تحديد ظاهري و جيني للسلالات المعزولة مع تقييم أولي لقدرتها على التحميص ومن ثم تحديد قدرة السلالات المنتقاة منها على البقاء حية في وسائط جد حامضية لمدة ساعتين وفي وجود تركيزات مختلفة من الأملاح الصفراوية. أخيراً، تمت دراسة القدرة على الالتصاق مع ثلاثة نماذج خلوية ظهارية معوية مختلفة (Caco-2 TC7 ; HT29-MTX ; HT29-CL16E).

النتائج المتحصل عليها سمحت بإنتقاء أربعة سلالات من نوع ستريبتوكوكوس ماسيدونيكوس وسلالة من نوع ستريبتوكوكوس ثيرموفيلوس قريبة جينيا من السلالات النموذجية لهته الأنواع. أظهرت السلالات المنتقاة قدرة على تحمل درجة حموضة قريبة من 3 وتركيز أملاح صفراوية يصل إلى 10 ميلي مول على عكس السلالات النموذجية التي تمت تجربتها. من جانب آخر، أظهرت السلالات المنتقاة قدرة كبيرة على الالتصاق بالخلايا الظهارية المعوية المستخدمة.

ترشح نتائجا الأولية سلالات ستريبتوكوكوس ماسيدونيكوس و ستريبتوكوكوس ثيرموفيلوس المنتقاة لإستخدامات مستقبلية كمعينات حيوية. مايستلزم القيام بأبحاث مكملة لهذه الدراسة.

كلمات مفتاحية : ستريبتوكوكوس ماسيدونيكوس، ستريبتوكوكوس ثيرموفيلوس، مشتقات الحليب التقليدية، Caco-2
TC7 HT29-MTX ; HT29-CL16E

The aim of this work is to select a set of new strains of non-pathogenic thermophilic streptococci namely *S. thermophilus* and *S. macedonicus* from traditional Algerian fermented milk samples (*lben* and *rayeb*) and to characterize some properties prior to a probiotic effect (abilities to resist environments simulating the conditions of the gastrointestinal tract [GIT] and to adhere to intestinal epithelial cells *in vitro*).

The methodology adopted in this work consists of phenotypic (growth in Bile Esculin Azide, 6.5% w/v NaCl, pH 9.6) and genotypic identification (sequencing of 16S rRNA, STIs and RAPD and MLST techniques) of the isolates from *lben* and *rayeb*, as well as an assessment of their acidification capacity, thus allowing a first characterization of the strains. Then, in a second step, the selected strains are studied for their ability to survive for 2 hours at low pH values and at different concentrations of an equimolar mixture of bile salts (MBS). Three cellular models Caco-2 TC7, HT29-MTX and HT29-CL16E were used for the study of adhesion.

Results were obtained from four strains of *S. macedonicus* genetically distinct from the reference strain *S. macedonicus* ACA-DC-198 and from one strain of *S. thermophilus* also different from the strain *S. thermophilus* LMD-9. These strains are capable of surviving down to pH 3 and tolerate high concentrations of bile salts (10 mM) in opposition to reference strains *Streptococcus thermophilus* LMD-9 and *Lactobacillus rhamnosus* GG. In addition, the studied strains have adhesion ability similar to that of *Lactobacillus rhamnosus* GG on Caco-2 TC7. on the other hand, strains *S. macedonicus* PA and *S. thermophilus* LF9 have good adhesion qualities to HT29-MTX and HT29-CL16E mucus cells.

This first characterization makes it possible to consider the strains of *S. macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* as potential candidates for prospective probiotic effects which deserve to be studied further more.

Key words : *Streptococcus macedonicus* ; *Streptococcus thermophilus* ; Traditional fermented milks ; Caco-2 TC7 ; HT29-MTX ; HT29-CL16E

Résumé

L'objectif de ce travail est la sélection de nouvelles souches de streptocoques thermophiles non-pathogènes à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Streptococcus macedonicus* dans des laits fermentés traditionnels algériens (*lben* et *rayeb*) et la caractérisation de quelques propriétés préalables à un effet probiotique (la capacité à résister aux environnements simulant les conditions du Tractus gastro-intestinal (TGI) et à adhérer aux cellules épithéliales intestinales *in vitro*).

La méthodologie adoptée dans le présent travail consiste en une identification phénotypique (croissance dans la Bile Esculine Azide, 6,5% de NaCl et pH 9,6) et génotypique (séquençage de l'ARNr 16S, des ITS et les techniques RAPD et MLST) des isolats, issus de *lben* et *rayeb*, ainsi qu'une évaluation de leur capacité d'acidification permettant une première caractérisation des souches. Ensuite, dans un deuxième temps, les souches sélectionnées sont caractérisées sur leurs capacités à survivre 2h à bas pH et à différentes concentrations d'un mélange équimolaire de sels biliaires (MSB). Trois modèles cellulaires Caco-2 TC7, HT29-MTX et HT29-CL16E ont été utilisés pour l'étude de l'adhésion.

Les résultats obtenus ont aboutit à quatre souches de *Streptococcus macedonicus* génétiquement distinctes de la souche de référence *Streptococcus macedonicus* ACA-DC-198 et une souche *Streptococcus thermophilus* également différente de la souche *Streptococcus thermophilus* LMD-9. Ces souches sont capables de survivre jusqu'à pH 3 et tolèrent des concentrations élevées en sels biliaires (10 mM) contrairement aux souches de références *Streptococcus thermophilus* LMD-9 et *Lactobacillus rhamnosus* GG. Par ailleurs, les souches étudiées présentent globalement une adhésion similaire à celle de *Lactobacillus rhamnosus* GG sur Caco-2 TC7. De surcroît, les souches *Streptococcus macedonicus* PA et *Streptococcus thermophilus* LF9 exercent de bonnes qualités d'adhésion aux cellules à mucus HT29-MTX et HT29-CL16E. Cette première caractérisation permet de considérer les souches de *Streptococcus macedonicus* et *Streptococcus thermophilus* comme de potentiels candidats à d'éventuels effets probiotiques qui méritent d'être explorés.

Mots clés : *Streptococcus macedonicus* ; *Streptococcus thermophilus* ; laits fermentés traditionnels ; Caco-2 TC7 ; HT29-MTX ; HT29-CL16E