

République Algérienne Démocratique et Populaire



Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة



DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

LADJAL IMENE

BENYOUCEF IKRAM

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Génétique fondamentale et appliquée

THÈME

**Analyse du gène ARNr 16S chez une souche
bactérienne lactique isolée à partir du blé
fermenté, par l'utilisation des outils
bioinformatiques d'analyse de séquence.**

Soutenu le 24/09/2025

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président	CHIBANI Abdel Wahab	Université de Mostaganem
Examinatrice	BRAHAMI Nabila	Université de Mostaganem
Encadrante	ABBASSENE Fatiha	Université de Mostaganem
Co-Encadrant	BENTAHAR Mohamed Cherif	Université de Mostaganem

Année universitaire 2024/2025

Remerciements

Nous exprimons nos sincères remerciements à notre encadrante, Dr. ABBASSENE Fatiha, pour son suivi rigoureux, ses orientations précieuses et sa disponibilité tout au long de l'élaboration de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont également à notre co-encadrant, Mr. BENTAHAR Mohamed Cherif, pour son accompagnement et ses conseils constructifs qui ont largement contribué à l'aboutissement de ce travail.

Nous remercions aussi Dr. BRAHAMI Nabila, présidente du jury, ainsi que Pr. CHIBANI Abdelwahad, examinateur, pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'évaluer ce mémoire, leurs remarques et leurs critiques ont été très précieuses pour l'amélioration de notre document.

Nos remerciements s'adressent également à notre camarade, l'étudiante, BENDIDA Amina, pour son soutien et son esprit de collaboration durant ce parcours.

Enfin, nous remercions l'ensemble du corps enseignant du Département de Biologie pour la qualité de leur enseignement et leur accompagnement tout au long de notre formation universitaire.

Dédicaces

À nos chers parents, pour leur amour inconditionnel, leurs sacrifices et leur soutien indéfectible.

À nos familles, sources de force et de réconfort.

À nos amies proches, et en particulier à notre chère amie Amina Bendida, pour son appui sincère, sa bienveillance et sa présence constante à nos côtés.

Nous dédions également ce travail à nous-mêmes, en reconnaissance de nos efforts communs, de notre persévérance et de notre volonté partagée qui nous ont permis d'atteindre cette étape importante de notre parcours académique.

Résumé :

Les bactéries lactiques représentent un groupe de microorganismes largement exploités dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, en raison de leur capacité à produire de l'acide lactique et à manifester des activités antimicrobiennes. Dans ce travail, nous avons réalisé une série de tests de caractérisation d'une souche bactérienne isolée à partir d'un blé fermenté de façon traditionnelle appelé *Homidh*), en combinant des techniques classiques (observation morphologique des colonies, coloration de Gram, tests biochimiques) avec des analyses moléculaires basées sur l'étude du gène de l'ARNr 16S. Le séquençage selon la méthode de Sanger a été effectué au niveau d'un laboratoire français, suivi d'un traitement bioinformatique que nous avons réalisé à l'aide des logiciels Unipro UGENE, BLASTn (base de données NCBI) et MEGA pour la construction de l'arbre phylogénétique. Les résultats ont montré une similarité de 99,93 % avec *Levilactobacillus brevis*, l'analyse phylogénétique a confirmé que la souche HM07 se regroupe avec *L. brevis*, suggérant une proximité taxonomique. Ces données suggèrent un potentiel biotechnologique notable, notamment dans le développement de probiotiques ou la fabrication de produits fermentés à valeur ajoutée. Cette étude met en évidence l'apport essentiel de la bioinformatique dans l'identification rapide et fiable de bactéries inconnues, ouvrant ainsi de larges perspectives d'application dans les domaines de la nutrition et de la santé.

Mots-clés : Bactéries lactiques, ARNr 16S, BLASTn, Bioinformatique, *Levilactobacillus brevis*, Arbre phylogénétique.

Abstract :

Lactic acid bacteria are among the most important microbial groups widely used in the food and pharmaceutical industries, owing to their ability to produce lactic acid, and exhibit antimicrobial activities. In this study, we conducted a series of tests to characterize a bacterial strain isolated from traditionally fermented beverage called (*Homidh*).” The identification combined conventional techniques (colony morphological observation, Gram staining, and biochemical assays) with molecular approaches based on the study of the 16S rRNA gene. The gene was sequenced using the Sanger method in a French laboratory, followed by bioinformatics analysis employing Unipro UGENE, BLASTn (NCBI), and MEGA software for phylogenetic tree construction. The results revealed a 99.93% similarity with *Levilactobacillus brevis*, phylogenetic analysis confirmed that strain HM07 clusters with *L. brevis*, suggesting a close taxonomic relationship.. These findings highlight its promising biological and technological potential, particularly for probiotic development or the production of value-added fermented products. This study also emphasizes the crucial role of bioinformatics in the rapid and accurate identification of unknown bacteria, opening broad perspectives for applications in nutrition and health.

Keywords: Lactic acid bacteria, 16S rRNA, BLASTn, Bioinformatics, *Levilactobacillus brevis*, Phylogenetic tree.

الملخص :

تُعدّ البكتيريا اللبنية من أهم المجموعات الميكروبية المستخدمة على نطاق واسع في الصناعات الغذائية والصيدلانية، وذلك بفضل قدرتها على إنتاج حمض اللاكتيك، وإظهار نشاطات مضادة للميكروبات. في هذا البحث أجرينا سلسلة من الاختبارات الخاصة بتمييز سلالة بكتيرية عُزلت من قمح مخمّر تقليديا المسمى (حميض) وذلك بالجمع بين تقنيات تقليدية الملاحظة المورفولوجية للمستعمرات، صبغة غرام، والاختبارات البيوكيميائية (وتقنيات جزيئية اعتمدت على دراسة جين ARNr 16S وقد أنجز تسلسل الجين وفق طريقة سانغر في أحد المخابر الفرنسية، تلاه تحليل معلوماتي حيوي باستعمال برامج Unipro UGENE وقاعدة بيانات (NCBI) BLASTn ولبناء الشجرة التطورية MEGA. أظهرت النتائج تشابهاً بلغت نسبته % 99.93 مع *Levilactobacillus brevis* كما أكد التحليل الفيلوجيني أن السلالة HM07 تنتمي مع *L. brevis*، مما يشير إلى قربها التصنيفي. وتشير هذه المعطيات إلى امتلاكها قدرة بيولوجية وتكنولوجية واعدة، خصوصاً في تطوير البروبيوتيك أو في تصنيع منتجات مخمّرة ذات قيمة مضافة. وتُبرز هذه الدراسة الدور الجوهري للمعلوماتية الحيوية في التعريف السريع والدقيق بالبكتيريا غير المعروفة، بما يفتح آفاقاً واسعة للتطبيقات في مجالي التغذية والصحة.

الكلمات المفتاحية : البكتيريا اللبنية، المعلوماتية الحيوية، شجرة النشوء والتطور.

Table des matières :

Remerciements	i
Dédicace	ii
Résumé	iii
Liste de figures	x
Liste de tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
Introduction	01

Première partie : synthèse bibliographique

Chapitre I :La bioinformatique

I.1.Définition	06
I.2.Historique	06
I.3. Le rôle de la bioinformatique	08
I.4.Importance de la bioinformatique	08
I.5.Objectifs et applications de la bioinformatique	08
I.6.Les domaines de la bioinformatique	09

Chapitre II :Les outils et les données de la bioinformatique

II.1.Définition des outils de la bioinformatique	12
II.2.Exemple d'outils de la bioinformatique	12
II.3.Rôle des outils bioinformatiques dans le diagnostic moléculaire des maladies génétiques	12
II.4.Définition des bases de données	13
II.5.Exemples de bases de données	13
II.6.Rôle des bases de données dans le diagnostic moléculaire des maladies génétiques	14
II.7.L'importance des outils et des bases de données dans la recherche génétique	15
II.8.Avantages des outils bioinformatiques et des bases de données	16
II.9.Limites des outils bioinformatiques et des bases de données	16

II.10.Critères de sélection des outils et bases de données en bioinformatique	17
II.11.Évolution et perspectives des outils et des bases de données depuis 2015	17

Chapitre III : Les Bactéries Lactiques

III.1.Définition des Bactéries Lactiques	19
III.2.Origine des bactéries lactiques	19
III.3.Caractéristiques générales des bactéries lactiques (LAB)	19
III.4.Classification des bactéries lactiques (LAB)	20
III.5.Aspects génétiques des bactéries lactiques	21
III.6. Intérêts des bactéries lactiques	22
III.7.Définition de l'ARNr 16S	23
III.8. Identification classique et moléculaire de bactéries à l'aide du gène ARNr 16S	23
III.9. Arbre phylogénétique et gène ARNr16s	24
III.9.1. Définition de l'arbre phylogénétique	24
III.9. 2. Analyse phylogénétique basée sur l'ARNr 16S	24
III.10.Limites de l'utilisation de l'ARNr 16S en génétique microbienne	25

Deuxième partie : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodologie

I.1.But du travail	28
I.2.Objectifs	28
I.3.Partie pratique	28
I.3.1Matériels utilisés	28
I.3.1.1.Milieus de culture et réactifs	28
I.3.1.2.Appareils et équipements	29
I.3.2.Méthodologie	29
I.3.2.1.Préparation des milieux de culture	29
I.3.2.2. Souches bactériennes environnementales	29
I.3.2.3.Réactivation de la souche	30
I.3.2.4. Purification des souches bactériennes	30
I.3.2.5. Identification des souches	30
a) Caractères cultureux et morphologiques	30

b) Caractères biochimiques	30
I.3.2.6. Identification dans la galerie API 50 CH	31
I.3.2.7. Outils et procédures moléculaire	32
A. Extraction de l'ADN bactérien	32
B. Électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose au Laboratoire INRA-MICA, Université Paris-Saclay (Jou-en-Josas)	33
C. PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) au laboratoire INRA-MICA, Université Paris-Saclay (Jou-en-Josas)	34
D. Séquençage de l'ADN au laboratoire Eurofins Genomics	35
I.4.Partie Bioinformatique	35
I.4.1. Introduction de l'analyse bioinformatique	35
I.4.2. Matériel et logiciels utilisés	36
I.4.3. Méthodologie	36
I.4.3.1 Préparation et correction de la séquence HM7	36
I.4.3.2 Analyse de la séquence par BLASTn	38
I.4.3.3 Construction de l'arbre phylogénétique avec MEGA 12	39

Chapitre II :Résultats et discussion

II.1.Partie pratique	42
II.1.1.Réactivation de la souche	42
II.1.2. Identification des souches	43
II.1.2.1. Caractères cultureux et morphologiques	43
II.1.2.2.Test de catalase	45
II.1.2.3. Identification dans la galerie API 50 CH	46
II.1.3. Outils et procédures moléculaire	50
II.1.3.1. Extraction de l'ADN bactérien	50
II.1.3.2. Électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose	50
II.1.3.3. Réaction de PCR du gène ARNr 16S	52
II.1.3.4.Séquençage de l'ADN	52
II.2.Partie Bioinformatique	53
II.2.1 Préparation et correction de la séquence HM7	53
II.2.2.Analyse de la séquence par BLASTn	55
II.2.3. Fiche d'identité de la souche bactérienne identifiée	57
II.2.3.1.Classification taxonomique la bactérie lactique étudiée	58

II.2.4. Construction de l'arbre phylogénétique avec MEGA 12	59
Conclusion	62
Références bibliographique	64
Annexe	73

Liste de figures

N°	Titre	Page
Figure 01	Croissance annuelle de la base de données GenBank entre 2009 et 2024, en nombre de séquences et de paires de bases.	09
Figure 02	Morphologie de A : <i>Lactobacillus casei</i> et B : <i>Lactobacillus acidophilus</i> (Examen en microscopie électronique, ×7000).	20
Figure 03	Arbre phylogénétique des bactéries Gram positives basé sur la comparaison des séquences de l'ARNr.	21
Figure 04	Dispositif d'électrophorèse sur gel d'agarose pour la séparation des composés colorés.	33
Figure 05	Affichage de la séquence HM7 brute dans Unipro UGENE avant correction.	38
Figure 06	Interface de l'outil BLASTn utilisée pour l'analyse de la séquence d'ARNr 16S.	39
figure07	Interface d'alignement multiple dans MEGA 12 montrant la séquence cible HM7 et les séquences de référence alignées via l'algorithme Muscle (type ADN).	40
Figure 08	Croissance de la souche HM7 sur gélose MRS après réactivation post-réfrigération à 6 °C.	42
Figure 09	Aspect macroscopique des colonies bactériennes obtenues avec la souche étudiée.	43
Figure 10	Aspect microscopique de l'isolat bactérien après la coloration de Gram (×6000) .	45
Figure 11	Résultat du Test de catalase.	46
Figure 12	Résultats du test API 50 CH pour la souche HM7	47
Figure 13	Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose du produit PCR du gène ARNr 16S de la souche HM7.	51
Figure 14	Segment de la séquence du gène ARNr 16S après correction manuelle, illustrant l'élimination des ambiguïtés (codes IUPAC) .	54

Figure 15 Arbre phylogénétique construit selon la méthode du Maximum de Vraisemblance à partir de la séquence du gène ARNr 16S. **60**

Liste de tableaux

N°	Titre	Page
tableau 01	Description macroscopique de la souche étudiée .	44
tableau 02	Description microscopique de la souche HM7.	45
Tableau 03	Résultats du test API 50 CH pour la souche HM7.	47
tableau 04	Comparaison des résultats de fermentation de la souche HM7 avec ceux rapportés pour d'autres souches similaires.	49
tableau 05	Résumé des résultats d'alignement BLASTn.	56
tableau 06	Fiche d'identité de la bactérie lactique étudiée, <i>Levilactobacillus brevis</i> (souche NS2301G3).	57

Liste des abréviations :

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNr 16S : Acide ribonucléique ribosomal 16S

API 50 CH : Analytical Profile Index (50 carbohydrates)

BLASTn : Basic Local Alignment Search Tool (nucléotides)

HM7 : Homidh

LAB : Lactic Acid Bacteria

MRS : Man, Rogosa and Sharpe

PCR : Polymerase Chain Reaction

dNTP : Désoxyribonucléoside triphosphate

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

Taq : *Thermus aquaticus*

PBS : Phosphate Buffered Saline

SDS : Sodium dodecyl sulfate

TE : Tampon Tris-EDTA

EtBr : Bromure d'éthidium

TBE : Tampon Tris-Borate-EDTA

UV : Ultraviolet

NCBI : National Center for Biotechnology Information

MEGA 12 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 12

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry

nt : Nucleotide

Introduction :

Introduction :

Dans le contexte de l'évolution scientifique rapide que connaît le monde, notamment dans les domaines de la biotechnologie et de la microbiologie appliquée, l'étude des micro-organismes, en particulier les bactéries, occupe une place centrale dans plusieurs secteurs tels que la santé publique, l'industrie agroalimentaire et la recherche scientifique. Parmi ces micro-organismes, les bactéries lactiques (LAB) se distinguent par leur rôle essentiel dans les processus de fermentation, ainsi que par leurs propriétés probiotiques bénéfiques pour la santé humaine et l'équilibre du microbiote intestinal (Axelsson, 2004 ; Hill et al., 2014 ; Marco et al., 2017).

Cependant, l'identification précise de ces bactéries, en particulier celles isolées à partir d'environnements naturels comme les aliments fermentés traditionnels, reste un véritable défi en raison de la forte similitude de leurs caractéristiques phénotypiques. Il devient donc nécessaire d'adopter une approche intégrée combinant des analyses phénotypiques (coloration de Gram, test à la catalase, galeries API) et des analyses moléculaires basées sur l'étude de l'ADN, en particulier le gène ARNr 16S, considéré comme un marqueur moléculaire de référence en taxonomie bactérienne (Cappuccino & Welsh, 2019; Clarridge, 2004; Janda & Abbott, 2007).

L'émergence de la bioinformatique a révolutionné le domaine de l'identification microbienne, en permettant l'analyse rapide et précise des séquences génétiques. Grâce à des outils tels que BLAST et l'analyse phylogénétique, il est désormais possible de comparer les séquences nouvellement obtenues à celles contenues dans les bases de données internationales, ouvrant ainsi de larges perspectives pour l'étude de la diversité microbienne (Baxevanis & Bateman, 2015; Johnson et al., 2022; Huang & Li, 2024).

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude, qui vise à analyser une souche bactérienne isolée à partir d'un aliment fermenté traditionnel, et désignée sous le nom de HM7. Après isolement et culture de la souche dans des milieux appropriés, une série d'analyses phénotypiques et moléculaires a été réalisée dans le but de caractériser cette souche et de déterminer sa position taxonomique. Une attention particulière a été accordée au séquençage partiel du gène ARNr 16S, suivi d'une analyse bioinformatique des résultats obtenus (Rodicio & Mendoza, 2004; Johnson et al., 2019).

Nous émettons, dans ce contexte, les hypothèses suivantes : la souche HM7 appartiendrait probablement à la famille des *Lactobacillaceae* sur la base de ses caractéristiques phénotypiques ; l'analyse du gène ARNr 16S permettrait une identification taxonomique plus fine ; enfin, la confrontation des résultats biochimiques et bioinformatiques pourrait révéler un rapprochement ou un éloignement par rapport à des espèces bactériennes déjà répertoriées, ce qui permettrait une classification fiable de la souche HM7 étudiée (Felis & Dellaglio, 2007; Zheng et al., 2020).

Ce mémoire est composé de trois parties principales : la première est une revue bibliographique présentant les bactéries lactiques ainsi que les méthodes d'identification disponibles ; la deuxième, intitulée « Matériels et Méthodes », décrit les techniques utilisées ; enfin, la troisième partie expose les résultats obtenus et les discute à la lumière des travaux antérieurs. Ce travail se conclut par une synthèse générale et des perspectives de recherche future. .(Tortora, Funke & Case, 2019).

Première partie
synthèse
bibliographique

Chapitre I:

La bioinformatique.

I.1.Définition:

La bioinformatique est un domaine qui regroupe plusieurs disciplines telles que la biologie, les statistiques et l'informatique. Elle se concentre sur l'analyse et le traitement de grandes quantités de données biologiques, notamment celles issues des études génomiques et protéomiques. Ce champ vise à développer des outils numériques permettant de mieux comprendre l'organisation des gènes, la structure des protéines et leurs interactions au sein des cellules. Il joue un rôle essentiel dans l'avancement de la recherche biologique et de la médecine moderne, en particulier la médecine personnalisée (Tapprich et al., 2020) .

Elle permet aussi de rendre les données biologiques plus accessibles et compréhensibles, en facilitant leur interprétation grâce à des outils informatiques adaptés.

I.2.Historique:

Le domaine de la bio-informatique n'est pas nouveau, puisqu'il existe depuis plus d'un demi-siècle.

- **De 1950 à 1970 : Les débuts** L'analyse des séquences de protéines a marqué les débuts de la bioinformatique, à une époque où le séquençage de l'ADN n'était pas encore réalisable et où les ordinateurs étaient encore en phase d'initialisation. Margaret Oakley Dayhoff, pionnière de la bioinformatique et chimiste américaine, a apporté une contribution majeure à ce domaine : elle a élaboré le premier programme d'assemblage de séquences protéiques, conçu la première base de données de protéines et introduit le système de codification à une lettre pour les acides aminés. Cela a constitué une étape cruciale dans l'élaboration de modèles évolutifs basés sur les séquences protéiques. (Gauthier et al., 2019) .
- **De 1970 à 1980 : Passage à l'analyse de l'ADN** : Suite au déchiffrement du code génétique, de nouvelles techniques de séquençage de l'ADN ont vu le jour, dont la technique de Sanger. Ces progrès ont été soutenus par des logiciels comme le Staden Package, qui ont simplifié l'analyse et la combinaison des séquences. Les séquences étaient désormais exploitées par les chercheurs pour établir des arbres phylogénétiques, et des modèles mathématiques tels que PAM (Point Accepted Mutation) ont été mis au point afin de repérer les modifications évolutives entre les acides aminés. (Gauthier et al., 2019) .

- **De 1980 à 1990 : Progrès dans le domaine de la biologie et de l'informatique:** Durant cette période, des méthodes fondamentales comme la PCR ont été développées, facilitant l'amplification de l'ADN. L'apparition des ordinateurs personnels s'est accompagnée de l'évolution de logiciels d'analyse tels que GCG et DNASTAR. Des bases de données globales, comme GenBank et EMBL, ont également été créées pour centraliser les données génétiques. Le mouvement des logiciels libres, promouvant le partage des outils scientifiques et l'accès ouvert au code source, a lui aussi émergé, contribuant ainsi à consolider la bioinformatique en tant que discipline scientifique autonome et établie. (Gauthier et al., 2019) .
- **De 1990 à 2000 : L'époque du génome et d'Internet.** Des initiatives de grande envergure (tel que le Projet du Génome Humain) ont été initiés, et des instruments d'analyse performants tels que BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ont émergé. L'accès aux informations et la publication des recherches ont été considérablement simplifiés par l'Internet, grâce à l'apparition de plateformes telles que PubMed. Cette époque a constitué un point de basculement crucial, au cours duquel la gestion de grandes quantités de données est devenue une réalité, renforçant ainsi la nécessité d'outils informatiques sophistiqués. (Gauthier et al., 2019) .
- **De 2000 à 2010 :** L'essor du séquençage de seconde génération et des mégadonnées. Les technologies de séquençage de seconde génération ont facilité l'acquisition rapide et économique de millions de lectures, ce qui a conduit à une augmentation massive du volume des données. Des organisations ont été constituées et d'importantes bases de données, tels que le SRA (Sequence Read Archive) et l'ENA (European Nucleotide Archive), ont été mises en place pour établir des normes relatives aux données. Face à l'accroissement des outils d'analyse, la nécessité d'examiner leur rendement et de mettre en parallèle leurs résultats est devenue manifeste. (Gauthier et al., 2019) .
- **De 2010 à 2025 :** Spécialisation, défis et perspectives d'avenir. La bioinformatique s'est affirmée en tant que spécialité distincte, et les universités ont commencé à offrir des programmes spécialisés pour éduquer des chercheurs dans ce secteur. Des outils d'analyse en ligne et des plateformes intuitives telles que Galaxy ont émergés, accompagnés d'une demande grandissante d'incorporer la bioinformatique de manière exhaustive dans la biologie. Des modèles numériques de créatures vivantes ont également vu le jour, préparant le terrain pour un futur où la représentation intégrale de la vie sera réalisable. (Gauthier et al., 2019) .

I.3. Le rôle de la bioinformatique:

La bioinformatique est un domaine moderne qui combine la biologie et l'informatique, et qui est utilisé pour analyser de grandes quantités de données biologiques générées par des technologies avancées. Cette discipline permet de comparer les séquences d'ADN et de protéines, de prédire les fonctions des gènes, et de modéliser la structure des molécules biologiques. Elle joue également un rôle important dans la découverte de biomarqueurs et la compréhension des processus complexes dans le corps humain (Steel et al., 2016).

I.4. Importance de la bioinformatique:

Aujourd'hui, la bioinformatique est devenue indispensable dans les domaines de la biologie et de l'ingénierie biologique. Avec l'évolution rapide des technologies comme le séquençage de l'ADN, l'imagerie cellulaire et la spectrométrie de masse, les chercheurs sont confrontés à des volumes gigantesques de données difficiles à exploiter manuellement. C'est ici que la bioinformatique intervient : elle nous permet d'analyser et d'interpréter ces informations avec rigueur et rapidité. Grâce à elle, on peut non seulement décrypter les structures moléculaires, mais aussi découvrir des biomarqueurs essentiels et comprendre des processus biologiques complexes. En complément de la méthode scientifique traditionnelle, elle offre une vision globale et innovante (Uesaka et al., 2022).

I.5. Objectifs et applications de la bioinformatique:

La bioinformatique joue un rôle essentiel dans la recherche scientifique, car elle permet de gérer de grandes quantités de données génétiques. Son objectif principal est de rassembler et d'organiser les séquences issues de différents organismes afin de faciliter leur étude et leur exploitation. Grâce à des outils comme GenBank, ces informations peuvent être stockées, consultées, analysées et partagées à l'échelle mondiale. Cela contribue fortement à des domaines comme l'étude des virus, l'analyse des génomes ou encore la mise au point de traitements. L'importance croissante de cette discipline est bien reflétée dans l'évolution des bases de données biologiques.

Cette progression est clairement visible dans la Figure 1, qui montre l'augmentation du nombre de séquences et de paires de bases enregistrées dans GenBank entre 2009 et 2024.

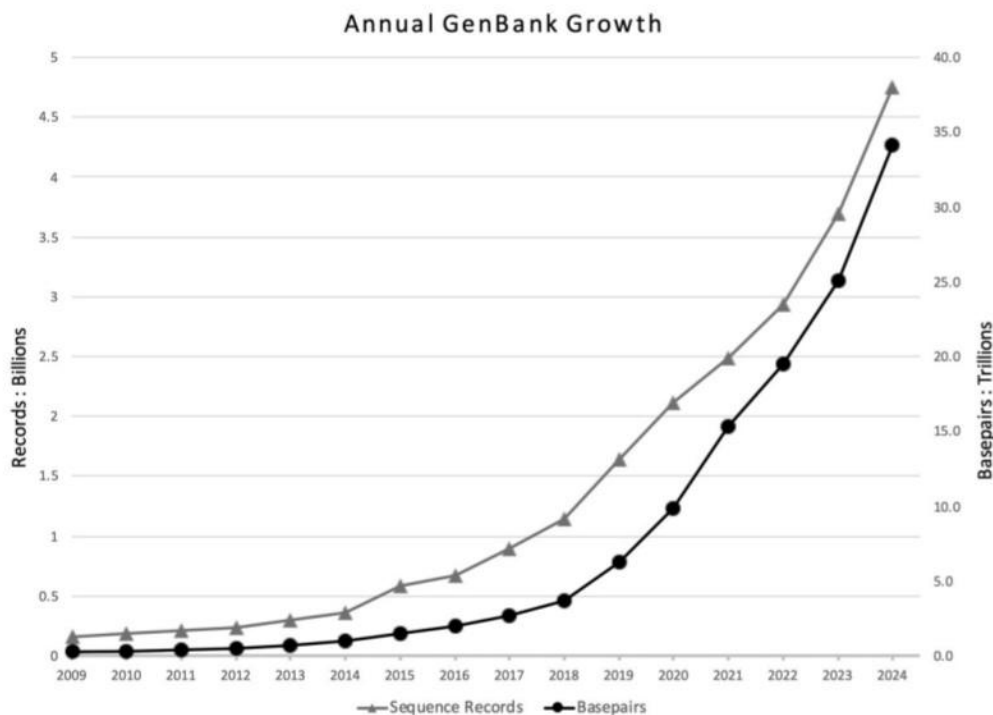


Figure 1: Croissance annuelle de la base de données GenBank entre 2009 et 2024, en nombre de séquences et de paires de bases (Sayers et al., 2025).

I.6. Les domaines de la bioinformatique:

Depuis 2015, ce domaine a connu une croissance significative, marquée par l'apparition de sous-domaines spécialisés. Voici un résumé des secteurs clés de la bioinformatique:

- ✓ **Analyse du séquençage génétique et génomique :** Ce champ d'étude englobe l'examen des séquences d'ADN, d'ARN et de protéines, la prévision des gènes et la compréhension de leurs rôles. Il englobe aussi la création de bases de données biologiques et d'instruments d'analyse (Sousa et al., 2016) .
- ✓ **Applications médicales et sanitaires :** La bioinformatique est mise en œuvre pour créer des instruments de diagnostic médical, d'assistance à la décision clinique et d'examen des données sanitaires, englobant la confidentialité ainsi que l'analyse prédictive des informations (Deng et al., 2015).

- ✓ **Les « omique », génomique, protéomique et métabolomique:** Ce champ d'étude concerne l'examen des données produites par les technologies omiques, comme la génomique et la protéomique, dans le but de saisir l'expression des gènes, les modifications épigénétiques et les circuits métaboliques (Li et al., 2019).

- ✓ **Apprentissage profond et intelligence artificielle en bioinformatique:** L'avènement des méthodes de *deep learning* a perfectionné l'analyse de données biologiques complexes, comme les séquences génétiques, les imageries médicales et les réseaux biologiques (Roumpeka et al., 2017).

- ✓ **Métagénomique et bioprospection:** Ce domaine est employé pour l'analyse des communautés microbiennes par le biais du séquençage de l'ADN environnemental, ce qui participe à la découverte de nouveaux gènes utilisables dans les secteurs industriel ou médical (Kashap et al., 2015).

- ✓ **Réseaux biologiques et modélisation informatique:** Ce champ d'étude englobe l'élaboration et l'examen de réseaux régulateurs et génétiques, ainsi que la simulation d'interactions moléculaires dans le but de saisir les comportements biologiques complexes (Laganà et al., 2015).

- ✓ **Bioinformatique de l'ARN non codant (ARNnc):** Ce domaine se focalise sur l'étude des ARN non codants, comme les microARN(miARN) et les long ARN non codants (IncARN), et leur impact sur la régulation de l'expression génique et des pathologies (Mount, 2004).

Chapitre II:

Les outils et les données de la bioinformatique.

II.1. Définition les outils de bioinformatique:

Les outils de bioinformatique sont des logiciels, bibliothèques ou plateformes numériques conçus pour l'acquisition, le traitement, l'analyse et l'interprétation de données biologiques, en particulier les séquences nucléotidiques et protéiques. Ils permettent d'extraire des informations pertinentes à partir de grands volumes de données issues des technologies de séquençage ou d'autres approches expérimentales en biologie moléculaire. Ces outils jouent un rôle fondamental dans la recherche biomédicale, la biologie évolutive et les sciences « omiques », en facilitant l'exploration des mécanismes biologiques à l'échelle moléculaire (Mount, 2004).

II.2. Exemple d'outils de la bioinformatique :

- **BLAST** : pour comparer des séquences d'ADN ou de protéines.
- **Clustal Omega** : pour l'alignement de séquences multiples.
- **MEGA** : pour construire des arbres phylogénétiques et analyser les séquences.
- **GROMACS** : pour la simulation de la dynamique moléculaire des protéines.
- **Bioconductor** : pour l'analyse des données d'expression génique (RNA-seq).
- **Galaxy** : une plateforme ouverte pour l'analyse des données biologiques sans programmation.

II.3. Rôle des outils bioinformatiques dans le diagnostic moléculaire des maladies génétiques :

Dans le domaine du diagnostic moléculaire, particulièrement pour les maladies génétiques, les instruments bioinformatiques ont une importance capitale. Ces derniers, grâce à leur aptitude à examiner et interpréter d'importantes quantités de données génétiques, proposent une identification des mutations causant diverses maladies héréditaires qui est plus rapide, plus précise et moins coûteuse:

- **Analyse des données de séquence génétique** : L'analyse des données issues des technologies de séquençage à haut débit (NGS) repose sur l'utilisation d'outils bioinformatiques spécialisés. Ces outils permettent d'aligner les séquences génétiques sur un génome de référence, d'identifier des variations génétiques (comme les SNPs ou les indels), et d'évaluer leurs impacts potentiels sur les fonctions biologiques (Mardis, 2017).

- **Développement de techniques de diagnostic avancées** :La technique CODE-seq (COpy number and DEep sequencing) est une méthode innovante qui combine le séquençage de l'exome complet avec la détection des variations du nombre de copies (CNV) dans un seul protocole intégré. Cette approche permet de gagner du temps et d'améliorer la précision du diagnostic moléculaire, en particulier dans les cas de maladies génétiques rares ou complexes, où les causes peuvent être liées à des duplications ou des délétions de gènes (Han et al., 2020).
- **Amélioration de la qualité du diagnostic génétique** :Les instruments de bioinformatique ont permis d'optimiser la qualité du diagnostic génétique en réduisant le temps d'analyse et les coûts financiers, tout en augmentant la précision de détection des mutations génétiques associées à diverses pathologies, grâce à des techniques comme le CODE-seq, qui intègre à la fois le séquençage de l'exome et l'analyse des CNV (Han et al., 2020).
- **Développement d'outils d'analyse de données génétiques** : De nouveaux instruments bioinformatiques, comme SpkNorm pour l'analyse des données de positionnement de la chromatine, ont été élaborés pour traiter les informations génétiques, ce qui contribue à approfondir notre compréhension des processus génétiques liés aux maladies (Arveiler, 2018).

II.4. Définition des bases des données :

Base de données des mutations génétiques humaines (Human Gene Mutation Database, HGMD) :Une base de données est un ensemble de données liées, organisées de manière à permettre un accès, une gestion et une analyse faciles grâce à des systèmes de gestion de bases de données (SGBD). Elles sont utilisées dans divers domaines, notamment en biologie, où les données biologiques sont stockées de façon structurée afin de faciliter leur analyse et leur utilisation dans les recherches scientifiques (Laperle, 2019).

II.5.Exemples de bases de données: Voici quelques bases de données:

- **MySQL** : Base de données relationnelle, open source.
- **PostgreSQL** : Puissante et gratuite, elle prend en charge des opérations complexes.
- **Oracle** : Commerciale, utilisée dans les grandes entreprises.
- **MongoDB** : NoSQL, adaptée aux données non structurées.

- **SQLite** : Légère, idéale pour les applications simples et mobiles.

II.6. Rôle des bases de données dans le diagnostic moléculaire des maladies génétiques:

Les bases de données génétiques jouent un rôle central dans le diagnostic moléculaire des maladies génétiques, en fournissant des informations précises et fiables sur les mutations génétiques associées aux maladies. Voici une présentation détaillée de leur rôle :

- **Base de données des mutations génétiques humaines (Human Gene Mutation Database, HGMD):**L’HGMD constitue une ressource cruciale pour obtenir des données sur les mutations génétiques associées aux maladies héréditaires. En 2017, elle recensait plus de 203 000 mutations détectées dans plus de 8 000 gènes, et elle se met à jour avec l’ajout de plus de 17 000 mutations par an. Ces informations sont fréquemment exploitées par les chercheurs, les spécialistes en médecine et les laboratoires de diagnostic afin de détecter les mutations à l’origine des maladies, ce qui aide à affiner l’exactitude du diagnostic et à déterminer le traitement adéquat (Stenson et al., 2020).
- **Rôle de HGMD dans le diagnostic moléculaire:**L’usage principal de la base de données HGMD est dans le diagnostic moléculaire des pathologies génétiques, étant donné qu’elle renferme des informations exhaustives concernant les mutations génétiques associées aux maladies. Ces informations facilitent la détection des mutations à l’origine de maladies, contribuant ainsi à affiner le diagnostic et à orienter le traitement adéquat. Cette base est aussi exploitée dans les recherches pour saisir les processus des mutations génétiques et élaborer de nouvelles approches thérapeutiques (Stenson et al., 2020).
- **Accès gratuit à la base de données HGMD:** HGMD offre une version publique sans frais pour les utilisateurs enregistrés au sein d’institutions académiques et d’organisations non lucratives. Malgré que la version publique soit moins riche en données comparativement à la version professionnelle, elle demeure un outil précieux pour obtenir des informations sur les modifications génétiques associées aux maladies héréditaires (Stenson et al., 2014).

- **Mises à jour de la base de données HGMD:** La base de données HGMD est fréquemment actualisée afin d'ajouter les mutations génétiques récentes associées aux maladies héréditaires. En 2020, cette base de données renfermait plus de 289 000 mutations identifiées réparties sur plus de 11 000 gènes, témoignant ainsi de son évolution constante et de l'amélioration de sa précision.(Stenson et al., 2020).
- **Utilisation de la base de données HGMD dans la recherche scientifique:** Cette base de données est utilisée dans le domaine scientifique pour examiner les processus des mutations génétiques et déceler celles qui sont à l'origine de diverses maladies. Ces informations facilitent la compréhension du lien entre les gènes et les pathologies, contribuant ainsi à l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques et à l'amélioration des techniques de diagnostic.(Stenson et al., 2017).

II.7.L'importance des outils et des bases de données dans la recherche génétique:

Dans la recherche génétique contemporaine, les outils bioinformatiques et les bases de données biologiques sont devenus indispensables, car ils fournissent aux scientifiques un accès structuré à une multitude d'informations concernant les séquences de gènes, les mutations et les relations génétiques entre diverses espèces.

Ils facilitent la gestion et l'analyse de grandes quantités de données génomiques, ce qui accélère la recherche sur les gènes impliqués dans des affections humaines et aide à mieux comprendre les processus biologiques complexes qui en découlent (Baxevanis & Bateman, 2015).

Par exemple, des bases de données telles que GenBank et Ensembl offrent des séquences génomiques de référence qui permettent d'identifier les variations génétiques associées à des maladies complexes telles que le cancer ou les maladies cardiovasculaires.

En outre, dans le domaine de la médecine personnalisée, ces instruments permettent de mieux cibler les traitements et d'améliorer les stratégies de prévention, contribuant ainsi à la conception de thérapies innovantes (Marson et al., 2013).

II.8. Avantages des outils bioinformatiques et des bases de données:

Les Avantages des outils bioinformatiques et des bases de données sont les suivants :

- **Analyse approfondie des données génétiques:** Les instruments de bioinformatique facilitent une étude détaillée des données génétiques, contribuant ainsi à la découverte de biomarqueurs associés aux maladies et à l'élaboration d'une médecine sur mesure.(Choi & Lee, 2022).
- **Accès libre à des bases de données biologiques:** Des bases de données comme NCBI et UniProt proposent une information biologique abondante et sans frais, qui sert à l'examen des séquences d'ADN et de protéines, ainsi qu'à l'interprétation des résultats issus d'expérimentations.(Bansal & Gupta, 2017).
- **Accélération des découvertes scientifiques grâce aux données ouvertes:** Les bases de données ouvertes au public et les efforts de partage d'informations favorisent une avancée rapide des découvertes et soutiennent une coopération internationale face à des enjeux biologiques complexes.(Moeinzadeh et al., 2020).

II.9.Limites des outils bioinformatiques et des bases de données:

- **Défis liés à la qualité et à l'intégration des données:** Les outils bioinformatiques et les bases de données présentent certaines limites, notamment en ce qui concerne la qualité et l'intégration des données. Des informations incomplètes ou incorrectes peuvent biaiser les résultats, et l'harmonisation des sources de données hétérogènes constitue un défi majeur (Zhao & Fung-Leung, 2020).
- **Manque de standardisation des formats de données:**La bioinformatique est confrontée à un déficit de normalisation des formats de données, rendant l'intégration des données provenant de diverses sources plus complexe.(Cano et al., 2018).
- **Limitations de performance face au volume croissant de données:**Face à l'accroissement constant du volume de données biologiques, les outils actuels peuvent éprouver des problèmes pour assurer une analyse efficace, ce qui nécessite la création d'instruments plus sophistiqués.(Moeinzadeh et al., 2020).

II.10.Critères de sélection des outils et bases de données en bioinformatique:

Il est primordial de se baser sur des ressources sûres et accessibles gratuitement lors de la sélection d'outils et de bases de données pour l'analyse des séquences génétiques. Le modèle « Job Dispatcher » de l'Institut Européen de Bioinformatique (EMBL - EBI) est considéré comme un standard dans ce domaine. Ce système fournit un accès sans frais à une vaste sélection d'applications pour l'analyse de séquences, comme BLAST, Clustal Omega et InterProScan, grâce à des interfaces web intuitives et des services web programmables. Il est élaboré pour être aisément maniable par les novices comme par les spécialistes, tout en garantissant une incorporation efficace des données et des analyses. Par ailleurs, ces instruments sont constamment actualisés afin de rester en adéquation avec les progrès scientifiques actuels.(Li et al., 2015).

Ces critères mettent en évidence l'importance de sélectionner des outils et des bases de données offrant précision, mise à jour constante, simplicité d'utilisation et accès gratuit, pour assurer la qualité et la crédibilité des résultats dans le domaine de l'analyse génétique.(Li et al., 2015).

II.11.Évolution et perspectives des outils et des bases de données depuis 2015:

Depuis 2015, les systèmes de bases de données ont connu une évolution importante. Ils ne se limitent plus aux modèles relationnels classiques, mais intègrent désormais de nouvelles approches comme les bases NoSQL, devenues de plus en plus utilisées en raison de leur capacité à gérer de grandes quantités de données non structurées. Ce changement a été motivé par le besoin croissant d'outils plus flexibles et évolutifs, notamment avec l'essor d'applications centrées sur les données, telles que MongoDB, Google Bigtable ou Amazon DynamoDB. Malgré cela, les bases relationnelles restent largement utilisées, surtout dans les systèmes nécessitant une structure stricte et une forte cohérence des transactions. Cette cohabitation entre les deux modèles permet aux organisations de choisir les solutions les mieux adaptées à leurs besoins spécifiques (Moniruzzaman & Hossain, 2013).

Chapitre III

Les Bactéries Lactiques

III.1.Définition des Bactéries Lactiques:

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes Gram positifs, non sporulants et généralement anaérobies facultatifs, qui produisent principalement de l'acide lactique par fermentation des glucides. Elles sont largement utilisées dans la fermentation des aliments et possèdent des propriétés probiotiques (Liu et al., 2014).

III.2.Origine des bactéries lactiques:

Les bactéries lactiques se trouvent naturellement dans des environnements riches en sucres tels que le lait, la viande, les légumes, les fruits, les céréales, ainsi que dans le sol et l'eau. Elles colonisent aussi les systèmes digestif, respiratoire et reproducteur chez l'homme et les animaux (Ayivi et al., 2020).

III.3.Caractéristiques générales des bactéries lactiques (LAB):

micro-organismes à Gram positif appartenant au phylum Firmicutes. Elles présentent généralement une morphologie en bacilles ou en coques, sont non mobiles, incapables de former des spores et catalase-négatives. Une des caractéristiques notables de ces bactéries est leur faible teneur en guanine-cytosine (G+C), ainsi que leur grande tolérance aux environnements acides. Cette aptitude leur permet de survivre dans des milieux hostiles comme l'estomac humain et de s'implanter durablement au sein du microbiote intestinal. On retrouve les LAB dans divers sites du corps humain, notamment au niveau de l'intestin, de la cavité buccale, de la peau, des voies respiratoires, du vagin et du lait maternel, avec une diversité particulièrement élevée observée au niveau intestinal. Parmi les genres les plus fréquemment rencontrés, on peut citer *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* et *Streptococcus thermophilus*. Sur le plan métabolique, les LAB sont classées en deux grandes catégories : les espèces *homofermentaires*, qui produisent uniquement de l'acide lactique à partir des glucides, et les espèces *hétérofermentaires*, qui génèrent également des sous-produits tels que l'éthanol, le dioxyde de carbone et l'acide acétique. En outre, certaines souches sont capables d'oxyder le lactate en peroxyde d'hydrogène, renforçant ainsi leur rôle dans la conservation des aliments grâce à leurs propriétés antimicrobiennes. Ces caractéristiques font des LAB des agents essentiels dans les industries alimentaires et probiotiques (Mokoena, 2017).

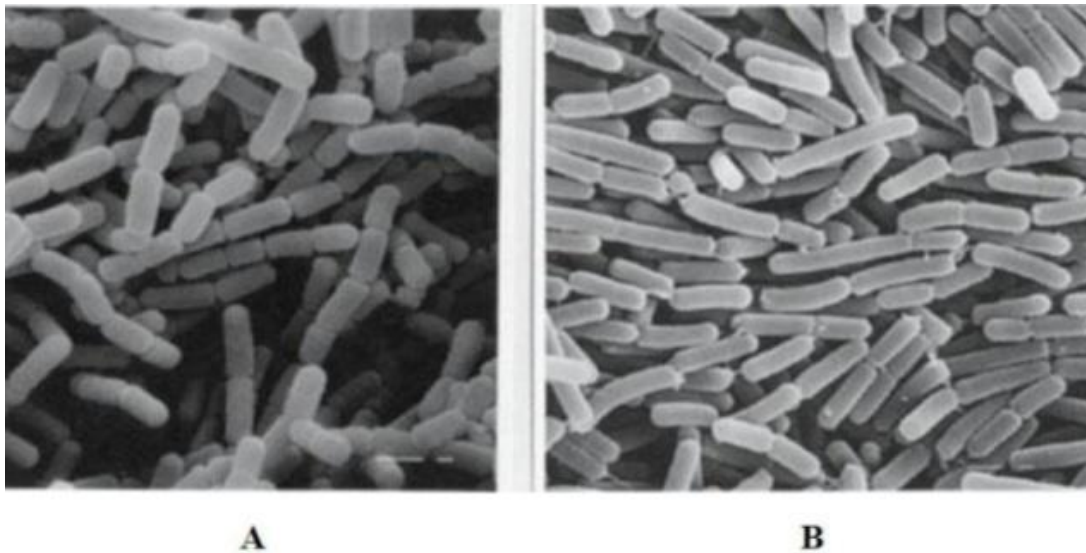


Figure02 : Morphologie de A : *Lactobacillus casei* et B : *Lactobacillus acidophilus* (Examen en microscopie électronique, $\times 7000$) (Barka & Khakha, 2021).

III.4. Classification des bactéries lactiques (LAB):

La classification des bactéries lactiques (LAB) repose principalement sur l'ordre des *Lactobacillales*, appartenant au phylum des *Firmicutes* et à la classe des *Bacilli*. Cet ordre comprend plusieurs familles majeures telles que *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Carnobacteriaceae* et parfois *Aerococcaceae*, selon les systèmes taxonomiques adoptés (König et al., 2009).

Parmi les genres les plus représentatifs de cet ordre, on retrouve *Lactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*. Ces micro-organismes se distinguent généralement par leur capacité à fermenter les glucides en acide lactique, leur incapacité à sporuler, leur tolérance aux environnements acides, ainsi que par leur aptitude à produire des composés antimicrobiens tels que les bactériocines, ce qui leur confère un rôle clé dans la conservation des aliments et la prévention des infections microbiennes (König et al., 2009 ; Mokoena, 2017).

Des études récentes de taxonomie moléculaire ont conduit à une reclassification importante du genre *Lactobacillus*, aboutissant à la création de plus de 23 nouveaux genres, sur la base de l'analyse des génomes entiers. Parmi ces nouveaux genres, on peut citer *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Latilactobacillus*, entre autres, afin de mieux refléter la diversité génétique

réelle de ce groupe. Par ailleurs, certains genres comme *Weissella* et *Oenococcus* ont été inclus dans la famille élargie des *Lactobacillaceae* selon cette révision taxonomique (Zheng et al., 2020).

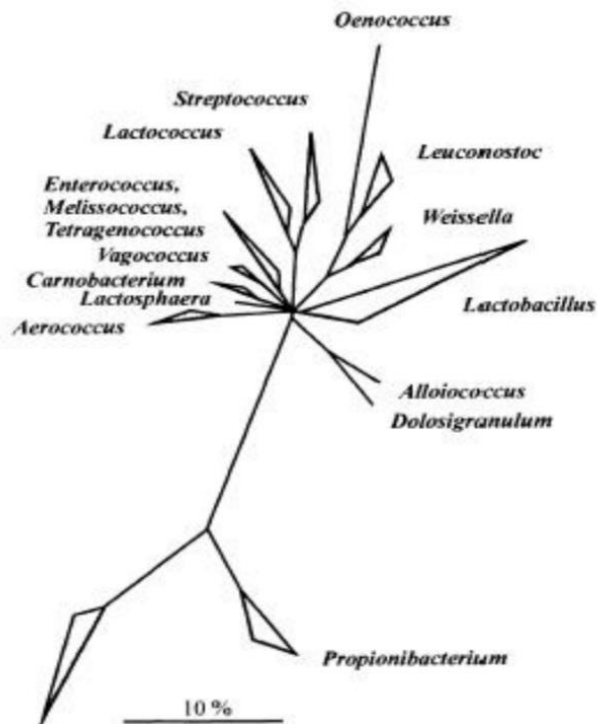


Figure 03 : Arbre phylogénétique des bactéries Gram positives basé sur la comparaison des séquences de l'ARNr (Holzapfel et al., 2001).

III.5.Aspects génétiques des bactéries lactiques:

Les bactéries lactiques présentent une grande diversité génétique, notamment en ce qui concerne la taille de leur génome. Par exemple, les génomes de *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus plantarum* mesurent environ 3,4 Mb. Des cartes de restriction ont été établies pour *Oenococcus oeni*, et le séquençage complet de plus de vingt espèces de LAB est aujourd'hui disponible. Parmi ces espèces figurent *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Oenococcus oeni* et *Pediococcus pentosaceus*, toutes impliquées dans des processus fermentaires, notamment en œnologie. Ces bactéries contiennent des plasmides circulaires et linéaires qui portent des gènes associés à la fermentation des glucides, à l'activité protéolytique, à la production de bactériocines, à la résistance aux antibiotiques et aux

mécanismes de défense contre les bactériophages. Par ailleurs, des phages ont été identifiés dans des genres tels que *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Oenococcus*, pouvant entraîner une interruption de la fermentation malolactique dans le vin.(König & Fröhlich, 2009).

III.6. Intérêts des bactéries lactiques:

- **Domaine de fermentation:** Les bactéries lactiques (BL) possèdent la capacité de transformer des sucres simples comme le glucose ou le lactose en acide lactique via des voies métaboliques spécifiques. Dans le cas de l'homofémentation, une molécule de glucose est convertie en deux molécules de lactate avec la génération de 2 molécules d'ATP ($\text{glucose} + 2 \text{ ADP} + 2 \text{ Pi} \rightarrow 2 \text{ lactate} + 2 \text{ ATP}$), tandis qu'en hétérofémentation, le glucose est transformé en lactate, éthanol (ou acétate), CO_2 , et une seule molécule d'ATP ($\text{glucose} + \text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{lactate} + \text{éthanol} + \text{CO}_2 + \text{ATP}$). Certaines souches de bactéries lactiques peuvent dissocier leur croissance cellulaire de la fermentation, nécessitant ainsi une source organique d'azote, comme les acides aminés, pour assurer leur prolifération. Cette aptitude permet d'importantes bioconversions de la matière organique en biomasse (Axelsson, 2004).
- **Domaine d'alimentation:** Les bactéries lactiques jouent un rôle fondamental dans la transformation des aliments fermentés, notamment par leur capacité à modifier la structure et la texture des produits. Par exemple, l'acidification du lait entraîne la création d'un caillé, dont la consistance dépend des souches bactériennes présentes. Selon le produit visé, on peut rechercher une texture ferme (comme dans le yaourt ferme) ou plus fluide et onctueuse (comme dans le kéfir ou le yaourt brassé). Pour atteindre une texture spécifique, l'usage combiné de souches acidifiantes et de souches productrices de polysaccharides est souvent pratiqué. Par ailleurs, les bactéries lactiques assurent une fonction de conservation par la production d'acide lactique, qui inhibe la croissance des flores microbiennes non souhaitées. Elles participent aussi à la production de composés organoleptiques comme le diacétyl et l'acétaldéhyde, responsables du goût et de l'arôme caractéristiques de nombreux produits laitiers (Marco et al., 2017).
- **Domaine de santé:** Certaines souches de bactéries lactiques sont reconnues comme probiotiques en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine. Elles facilitent la digestion du lactose, réduisent les épisodes de diarrhée (notamment celles induites par les antibiotiques ou les infections), participent à la réduction du cholestérol

sanguin et interviennent dans la déconjugaison des sels biliaires. Ces bactéries modulent également la flore intestinale, contribuant ainsi à réduire les déséquilibres et les processus de fermentation putréfiante au niveau intestinal. En plus de leurs effets digestifs, elles sont à l'étude pour leur potentiel dans la formulation de vaccins oraux, en raison de leur capacité à survivre dans le tractus gastro-intestinal et à interagir positivement avec le système immunitaire (Hill et al., 2014).

III.7.Définition de l'ARNr 16S:

L'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) est un composant essentiel de la petite sous-unité (30S) du ribosome bactérien. Ce gène, d'environ 1500 paires de bases, contient des régions hautement conservées permettant la conception d'amorces universelles, ainsi que des régions variables utiles pour différencier les espèces bactériennes. Comme illustré dans la figure 1, le ribosome bactérien se compose de deux sous-unités : la grande (50S) et la petite (30S), cette dernière contenant l'ARNr 16S.

Le gène ARNr 16S est localisé sur le chromosome bactérien, généralement au sein de l'opéron ribosomal (*rrn*) qui comprend également les gènes ARNr 23S et ARNr 5S. Il peut être présent en une ou plusieurs copies selon les espèces. L'intérêt majeur de ce gène réside dans son architecture particulière : il comporte à la fois des régions hautement conservées, permettant l'utilisation d'amorces universelles pour son amplification, et des régions variables (V1–V9) offrant un pouvoir discriminant pour différencier les genres et les espèces bactériennes. Ce double caractère explique pourquoi l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S constitue une méthode de référence en taxonomie bactérienne, utilisée pour l'identification, la classification et l'étude des relations phylogénétiques entre les micro-organismes. C'est un outil clé en microbiologie moléculaire et en écologie microbienne (Johnson et al., 2019)

III.8.Identification classique et moléculaire de bactéries à l'aide du gène ARNr 16S :

L'identification des bactéries peut se faire selon deux approches complémentaires :

- ❖ **Identification classique:** Identification classique également appelée identification phénotypique, repose sur l'observation des caractéristiques morphologiques, tinctoriales et biochimiques des bactéries. Ainsi, elle comprend généralement la coloration de Gram, l'observation microscopique, la morphologie des colonies sur

milieux solides, ainsi que des tests biochimiques tels que la catalase, l'oxydase, ou encore des systèmes commerciaux comme API 20E. Ces techniques permettent de classer les bactéries en genres ou familles sur la base de leur activité métabolique et de leurs caractéristiques enzymatiques. Même si ces méthodes sont facilement accessibles et historiquement primordiales en microbiologie, elles peuvent parfois manquer de précision, surtout lorsqu'il s'agit de différencier des espèces similaires ou des souches atypiques. (Mohammad et al., 2020)

- ❖ **Identification moléculaire:** L'identification moléculaire des bactéries repose principalement sur l'analyse du gène de l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S), une méthode très précise permettant la détermination de l'identité génétique des bactéries au niveau du genre ou de l'espèce. Cette approche comprend plusieurs étapes essentielles : l'extraction de l'ADN génomique, l'amplification du gène ARNr 16S par PCR, le séquençage du fragment amplifié, puis la comparaison de la séquence obtenue avec des bases de données en ligne à l'aide de l'outil BLAST. Enfin, une analyse phylogénétique peut être réalisée, par exemple avec le logiciel MEGA12, afin de situer la souche étudiée parmi d'autres séquences de référence. (Johnson, et al. 2019)

III.9. Arbre phylogénétique et gène ARNr16s:

III.9.1. Définition de l'arbre phylogénétique:

Un arbre phylogénétique est un diagramme ramifié qui illustre les relations évolutives entre des organismes ou des séquences génétiques, basé sur leurs similitudes ou différences moléculaires. Il peut être enraciné, ce qui signifie qu'un ancêtre commun est identifié, et les longueurs des branches peuvent représenter soit la quantité de divergence, soit le temps évolutif. Ces arbres sont construits à l'aide de méthodes telles que l'alignement de séquences, la parcimonie, le maximum de vraisemblance ou les approches bayésiennes (Zou et al., 2024).

III.9. 2. Analyse phylogénétique basée sur l'ARNr 16S:

L'analyse phylogénétique consiste à comparer les séquences de l'ARNr 16S entre différents isolats ou espèces puis d'établir une hypothèse des relations évolutives ou de parenté entre eux. Dans cet arbre, chaque branche indique un ancêtre commun et la proximité évolutive entre les entités étudiées. Le gène ARNr 16S permet notamment de distinguer les genres et les

espèces bactériennes, et est considéré comme la référence pour les études taxonomiques chez les procaryotes.

La construction de l'arbre se fait généralement après l'alignement des séquences obtenues, suivi par l'application d'algorithmes comme Maximum Likelihood tree de logiciels bioinformatiques tels que MEGA12. La topologie de l'arbre permet de confirmer ou de discuter l'identité des souches étudiées, notamment en comparant leur position par rapport à des souches de référence issues des bases de données comme GenBank.

III.10.Limites de l'utilisation de l'ARNr 16S en génétique microbienne:

Malgré son utilisation répandue dans l'identification bactérienne, l'ARNr 16S présente certaines limites importantes. Sa résolution peut s'avérer insuffisante pour distinguer des espèces très proches génétiquement, comme *Escherichia coli* et *Shigella*, qui partagent des séquences 16S quasiment identiques, rendant leur différenciation difficile (Janda & Abbott, 2007). De plus, des biais peuvent survenir lors de l'amplification PCR, notamment en raison du choix des amorces. Certaines amorces dites "universelles" peuvent favoriser l'amplification de certains taxons au détriment d'autres, entraînant une représentation inexacte de la diversité microbienne dans un échantillon (Tremblay et al., 2015).

Deuxième partie

Etude

expérimentale

Chapitre I

Matériel & méthodologie

I.1. But du travail :

Notre travail s'inscrit dans le cadre de l'identification d'une souche bactérienne inconnue, isolée précédemment à partir d'un blé concassé fermenté (*Homidh*), en se basant sur des analyses phénotypiques classiques et de biologie moléculaire, et en combinant d'autre part une approche bioinformatique, afin d'assurer une identification précise et fiable.

I.2. Objectifs :

- Réaliser une caractérisation phénotypique (culture, coloration de Gram, tests biochimiques).
- Extraire l'ADN génomique et amplifier le gène ARNr 16S par PCR.
- Séquencer le gène ARNr 16S.
- Analyser la séquence à l'aide d'outils bioinformatiques (BLAST, arbre phylogénétique) afin de positionner la souche dans une classification évolutive.

La partie pratique (caractérisation phénotypique) de ce travail a été réalisée au Laboratoire de Microbiologie n°1, relevant de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn Badis – Mostaganem, durant la période allant du 2 mars 2025 jusqu'au début du mois de mai de la même année.

Les analyses moléculaires (la PCR, électrophorèse) ont été réalisées au niveau du laboratoire Laboratoire INRA-MICALIS, Université Paris-Saclay (Jouy-en-Josas) et (séquençage) au laboratoire Eurofins Genomics .

I.3. Partie pratique:

I.3.1. Matériels utilisés:

I.3.1.1. Milieux de culture et réactifs:

- Milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe).
- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pour le test catalase.
- Colorants Gram (violet cristal, lugol, alcool, safranine).
- API 50 CH .

- Solution PBS (solution saline tamponnée au phosphate).

I.3.1.2.Appareils et équipements:

- Hotte à flux laminaire.
- Microscope optique.
- Incubateur à 37 °C.
- Centrifugeuse .
- Bain-marie .
- Vortex.

I.3.2.Méthodologie:

I.3.2.1.Préparation des milieux de culture:

Deux milieux ont été préparés : La solution PBS a été préparée suivant le protocole rapporté par Fadanka et al. (2022) (voir Annexe 2).

- MRS (de Man, Rogosa et Sharpe) : utilisé pour la culture des bactéries lactiques.
- PBS (Phosphate Buffered Saline) : solution tamponnée utilisée pour laver les cellules bactériennes (Kämpfer & Glaeser, 2012).

I.3.2.2.Souches bactériennes environnementales:

La souche bactérienne de Homidh (HM7), étudiée dans ce travail, appartient au groupe des bactéries lactiques. Elle a été initialement isolée à partir d'un blé concassé fermenté puis conservée dans un tube à essai contenant un bouillon MRS enrichi en glycérol stérile (20 %) comme agent cryoprotecteur, et stockée à une température de -20 °C pour une conservation à long terme.

I.3.2.3.Réactivation de la souche:

La réactivation de la souche bactérienne HM7 a été effectuée en ensemençant un aliquot de la souche conservée dans un bouillon MRS stérile, puis incubée à 37 °C pendant 24 heures sous agitation modérée. Par la suite, la culture a été repiquée sur un milieu MRS gélosé, puis

incubée à la même température pendant 24 à 48 heures afin d'assurer une croissance optimale et de préparer la souche pour les analyses ultérieures.

I.3.2.4. Purification des souches bactériennes :

➤ **Ensemencement en surface :** Il a été réalisé sur des boîtes de Pétri contenant du MRS gélosé, en étalant la suspension bactérienne de manière stérile à l'aide d'une anse de repiquage. Cette méthode vise à obtenir des colonies bien isolées, facilitant l'observation morphologique ainsi que la purification de la souche.

➤ **Ensemencement en bouillon :** a été effectué dans un milieu MRS liquide, en inoculant un volume précis de la souche dans un tube stérile, suivi d'une incubation à 37 °C pendant 24 heures sous agitation modérée. Cette approche permet d'obtenir une culture dense.

I.3.2.5. Identification des souches :

a) Caractères cultureux et morphologiques :

➤ **Étude macroscopique :** L'examen macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies (forme, taille, contour, pigmentation, surface...) en utilisant un microscope optique (Optech, Optical Technology). L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température d'incubation (Cappuccino & Welsh, 2019).

➤ **Étude microscopique :** En se basant sur la morphologie des cellules bactériennes et leur mode d'association observés par microscope optique. (Tortora, Funke, & Case, 2019).

b) Caractères biochimiques :

➤ **La coloration de Gram :** Constitue une technique microbiologique utilisée pour différencier les bactéries en fonction de la structure de leur paroi cellulaire en bactérie à Gram positif (retiennent le colorant violet) et en Gram négatif (ne retiennent pas de colorant et apparaissent en rose), elle permet également de classer leur forme en bâtonnets ou en coques, tout en fournissant des indications sur leur mode de regroupement. La coloration de Gram a été exécutée selon le protocole standard (annexe 03). Les observations ont été effectuées au microscope trinoculaire à caméra (Optech, Optical Technology)(Tortora, 2019).

- **Test de catalase :** Le test de catalase est une technique qui permet de détecter la présence de l'enzyme catalase dans une souche bactérienne. Certaines bactéries génèrent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est extrêmement nocif lors de leur respiration en aérobie. Il est dégradé grâce, à cette enzyme, en eau (H_2O) et en oxygène (O_2).
- **Procédure :** Une colonie bactérienne est prélevée à l'aide d'une anse de platine stérilisée et déposée sur une lame de verre. Ensuite, quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) sont ajoutées à la colonie. Si des bulles de dioxygène (O_2) apparaissent, cela indique un résultat positif et la présence de l'enzyme catalase. En revanche, en l'absence de réaction, cela signifie que l'enzyme catalase est absente.

I.3.2.6. Identification dans la galerie API 50 CH : Le système API 50 CH est une méthode biochimique standardisée utilisée pour étudier la capacité des bactéries à Gram positif à fermenter 49 types différents de sucres. Il est important de noter que le chiffre 50 ne correspond pas au nombre de sucres testés, mais au nombre total de cupules présentes sur la bande, dont l'une est utilisée comme témoin négatif sans sucre. Le changement de couleur de l'indicateur de pH, du violet au jaune, indique une acidification du milieu, signe d'une fermentation positive.

(Palomo et al., 2006).

- **Préparation de la galerie :** Au début, la bandelette API 50 CH a été placée dans une boîte d'incubation humidifiée afin de maintenir un taux d'humidité adéquat pendant toute la durée de l'analyse.
 - A. L'ADN de la souche bactérienne HM7 a d'abord été extrait à l'aide de la technique de centrifugation, permettant de séparer l'ADN des cellules après leur culture sur un milieu approprié.

Ensuite, une solution d'inoculation a été préparée en mélangeant l'ADN extrait avec un milieu MRS liquide stérile (non extrait), et le mélange a été bien homogénéisé afin d'obtenir une solution uniforme. À l'aide d'une seringue stérile de 10 mL, la solution a été distribuée dans les cupules de la bandelette API 50 CH, en veillant à remplir chaque cupule avec précision. La bandelette a ensuite été replacée dans une boîte d'incubation humidifiée.

- **Incubation de la galerie :** Après le remplissage de la galerie, celle-ci a été replacée dans la boîte d'incubation humidifiée, puis introduite dans l'étuve à une température de 37 °C pendant une durée de 24 à 48 heures.
- **Lecture des résultats :** À la fin de l'incubation, chaque cupule a été examinée individuellement. Un virage au jaune indique une fermentation positive du sucre correspondant, révélant l'activité enzymatique de la souche étudiée.

I.3.2.7. Outils et procédures moléculaires :

A). Extraction de l'ADN bactérien au Laboratoire INRA-MICA, Université Paris-Saclay (Jouy-en-Josas) :

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir de l'isolat bactérien (HM) préalablement conservé.

L'échantillon a été placé dans des microtubes Eppendorf de 2 mL contenant des billes d'oxyde de zirconium (ZrO₂) afin de faciliter la lyse mécanique des cellules.

L'homogénéisation a été effectuée à l'aide de l'appareil Precellys Homogenizer, selon le programme dédié à l'extraction d'ADN bactérien, comprenant plusieurs cycles d'agitation (de 5800 à 6300 tr/min) d'une durée de 15 à 30 secondes, entrecoupés de pauses courtes.

Après la lyse, les échantillons ont été refroidis temporairement puis centrifugés à 13 000 tr/min pendant 5 minutes afin de séparer les débris cellulaires du surnageant contenant l'ADN.

Environ 300 µL de surnageant ont été récupérés pour la suite du protocole d'extraction et de purification, conformément au protocole standard du laboratoire (INRA–MICALIX).

Cette méthode, basée sur la lyse mécanique à l'aide de billes de zirconium, est considérée comme une technique efficace pour améliorer le rendement et la qualité de l'ADN extrait (Manuel Precellys, 2020).

L'extraction de l'ADN a été réalisée en 2023 par M. BENTAHAR Mohamed Cherif, au laboratoire INRA–MICALIX, Université Paris-Saclay (Jouy-en-Josas, France).

B). Électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose au Laboratoire INRA-MICA, Université Paris-Saclay (Jouy-en-Josas) :

La qualité et l'intégrité de l'ADN extrait ont été vérifiées par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 %.

Le gel a été préparé dans une solution TBE 1X contenant directement le colorant fluorescent Midori Green, une alternative sûre et non toxique au bromure d'éthidium, substance connue pour sa toxicité et son caractère cancérigène.

L'incorporation du colorant dans le gel permet l'observation immédiate de l'ADN pendant l'électrophorèse, sans étape de coloration supplémentaire.

Après avoir mélangé les échantillons avec le tampon de charge, ceux-ci ont été déposés dans les puits du gel, aux côtés d'une échelle de poids moléculaire (ladder).

L'électrophorèse a été réalisée à 120 volts pendant environ 20 minutes, puis les bandes d'ADN ont été visualisées sous lumière UV à l'aide d'un système de documentation numérique.(Figure 4).

Cette manipulation a été effectuée par M. BENTAHAR Mohamed Cherif en 2023, au Laboratoire INRA-MICALIX (Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas,France)

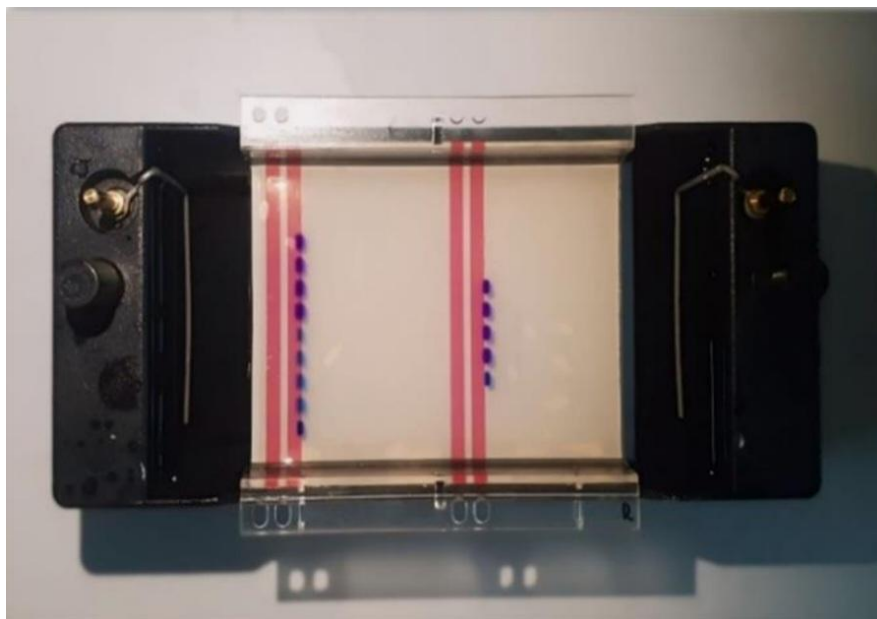


Figure 04 : Dispositif d'électrophorèse sur gel d'agarose pour la séparation des composés colorés.

C). PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) au laboratoire INRA-MICA, Université Paris-Saclay (Jouy-en-Josas) :

Afin d'identifier la souche bactérienne HM, l'amplification du gène ARNr 16S a été réalisée par la technique de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) au laboratoire INRA-MICA, Université Paris-Saclay (Jouy-en-Josas) en 2023.

Le mélange réactionnel a été préparé par M. BENTAHAR Mohamed Cherif Mesioubène dans des tubes stériles d'un volume final de 25 µL, contenant les composants suivants :

- 0,5 µL d'amorce J4 (10 µM)
- 0,5 µL d'amorce J7 (10 µM)
- 0,5 µL de dNTP (10 mM chacun)
- 2,5 µL de Green Buffer 10X
- 1 µL de DreamTaq ADN polymérase
- 0,1 µL d'ADN matrice
- 20,9 µL d'eau ultrapure stérile pour compléter le volume à 25 µL

Les amorces utilisées étaient :

- J7 (008F) : 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'
- J4 (1517R) : 5'- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA -3'

Les tubes ont été placés dans un thermocycleur (Biometra Tone, Allemagne) selon le programme suivant :Dénaturation initiale à 95 °C pendant 2 minutes ;30 cycles composés de :

- Dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes .
- Hybridation des amorces à 55–60 °C pendant 30 secondes .
- Élongation à 72 °C pendant 5 minutes.

Les produits PCR ont ensuite été conservés à 4 °C jusqu'à leur analyse. L'amplification a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose afin de confirmer la taille et la pureté des fragments amplifiés. Des pointes stériles ont été utilisées pour chaque réactif afin d'éviter toute contamination croisée. La température d'hybridation a été optimisée pour la paire d'amorces J4/J7 afin d'assurer la spécificité de l'amplification (Smith et Osborn,2021)

D). Séquençage de l'ADN au laboratoire Eurofins Genomics :

Le séquençage du gène ARNr 16S a été réalisé au laboratoire Eurofins Genomics (Allemagne) en 2023.

Avant le séquençage, les produits de PCR ont été purifiés afin d'éliminer les composants indésirables (amorces résiduelles, nucléotides libres et enzymes) selon un protocole standard.

Trois tubes distincts ont été envoyés au laboratoire :

1. Un tube contenant le produit purifié de PCR du gène 16S rRNA.
2. Un tube contenant l'amorce G4 (forward).
3. Un tube contenant l'amorce G7 (reverse).

La méthode de Sanger a été utilisée pour le séquençage, avec deux réactions distinctes utilisant les amorces forward et reverse. Les séquences obtenues ont été assemblées pour générer une séquence consensus couvrant la région ciblée du gène ARNr 16S.

Cette approche s'appuie sur les travaux de Heather & Chain (2016) sur l'histoire et les applications des méthodes de séquençage. Les résultats sont encore en attente pour la détermination précise de la souche bactérienne HM.

I.4.Partie Bioinformatique :

I.4.1. Introduction de l'analyse bioinformatique :

Dans le cadre de l'identification moléculaire des bactéries, les outils de bioinformatique jouent un rôle fondamental en permettant l'analyse, la comparaison et l'interprétation des séquences génétiques. L'utilisation de la séquence de l'acide ribonucléique ribosomique 16 S (ARN ribosomique 16 S — ARNr 16 S), considérée comme un marqueur moléculaire universel, constitue une approche fiable pour explorer les relations phylogénétiques entre les souches bactériennes. (Clarridge., 2004).

La méthodologie appliquée dans ce travail repose sur une série d'étapes bioinformatiques, allant de la préparation de la séquence à l'analyse phylogénétique. Pour cela, plusieurs logiciels ont été utilisés, notamment Unipro UGENE, BLASTn et MEGA 12. L'ensemble de ces outils a permis d'assurer une analyse rigoureuse et d'aboutir à une identification fiable de la souche bactérienne étudiée. (Clarridge., 2004).

I.4.2. Matériel et logiciels utilisés :

La séquence d'ARN ribosomique 16 S (ARNr 16 S) d'un échantillon bactérien isolé et a été analysée en vue de son identification à l'aide d'outils et de logiciels bioinformatiques.

Plusieurs séquences de référence du gène ARNr 16 S ont été utilisées à différentes étapes de l'analyse, notamment pour la correction, l'alignement et la comparaison phylogénétique.

Les outils et logiciels suivants ont été utilisés :

- **Unipro UGENE** : pour la visualisation, l'alignement et la correction de la séquence.
- **BLASTn** (Basic Local Alignment Search Tool – nucleotide) : pour l'identification de la séquence par comparaison avec une base de données en ligne.
- **MEGA 12** (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 12) : pour l'alignement multiple et la construction de l'arbre phylogénétique.

I.4.3. Méthodologie :

Après l'obtention de la séquence du gène ARN ribosomique 16 S de l'isolat bactérien, à l'aide de la méthode de séquençage Sanger a été réalisé par le laboratoire Eurofins Genomics en Allemagne une analyse bioinformatique a été entreprise dans le but de corriger la séquence, d'identifier l'organisme, et d'étudier ses relations phylogénétiques.

I.4.3.1 Préparation et correction de la séquence HM7 :

Les lectures initiales (forward et reverse) ont été obtenues par séquençage Sanger, réalisé par le laboratoire Eurofins Genomics (Allemagne), suite à l'envoi des produits de PCR par le Pr. Ben Tahar Mohamed Chérif. Les résultats ont été transmis sous forme de fichiers électroniques (.ab1) via la plateforme du laboratoire.

Nous avons ensuite importé ces lectures dans le logiciel Unipro UGENE, un outil open source permettant la visualisation, l'alignement et la correction des séquences d'ADN et d'ARN (Okonechnikov et al., 2018). Pour la correction, l'option « Map Reads to Reference » a été utilisée (via le chemin : Tools → Sanger Data Analysis → Map Reads to Reference).

Deux séquences ont alors été introduites : la séquence de référence, correspondant au gène 16S rRNA de *Levilactobacillus brevis* strain 6525, récupérée depuis la base de données NCBI GenBank, et la séquence brute (HM) à corriger. Ce choix s'explique par le fait que cette souche représente un modèle des bactéries lactiques, groupe auquel appartient notre isolat

étudié, et que sa séquence complète du gène 16S rRNA est validée, constituant ainsi un standard fiable pour l'alignement et la correction.

L'alignement a montré que les extrémités présentaient une qualité faible en raison de la présence des amorces (primers), tandis que la région centrale révélait une bonne concordance entre les lectures forward et reverse. Nous avons donc procédé à une correction manuelle des bases ambiguës sur la base de l'examen du chromatogramme (Figure 5) et du principe de complémentarité nucléotidique.

Durant cette étape, des caractères ambigus tels que N, R, Y, K, M, S, W, H, — ont été rencontrés. Ces codes suivent la nomenclature IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), utilisée pour représenter des positions nucléotidiques ambiguës ou mixtes dans les séquences d'ADN. Par exemple :

R = A ou G

Y = C ou T

K = G ou T

N = nucléotide inconnu

(National Center for Biotechnology Information, 2020).

Enfin, après correction, la séquence finale a été exportée au format FASTA, format standard pour les analyses bioinformatiques ultérieures telles que BLAST ou les alignements multiples, en vue de l'identification taxonomique des bactéries lactiques.

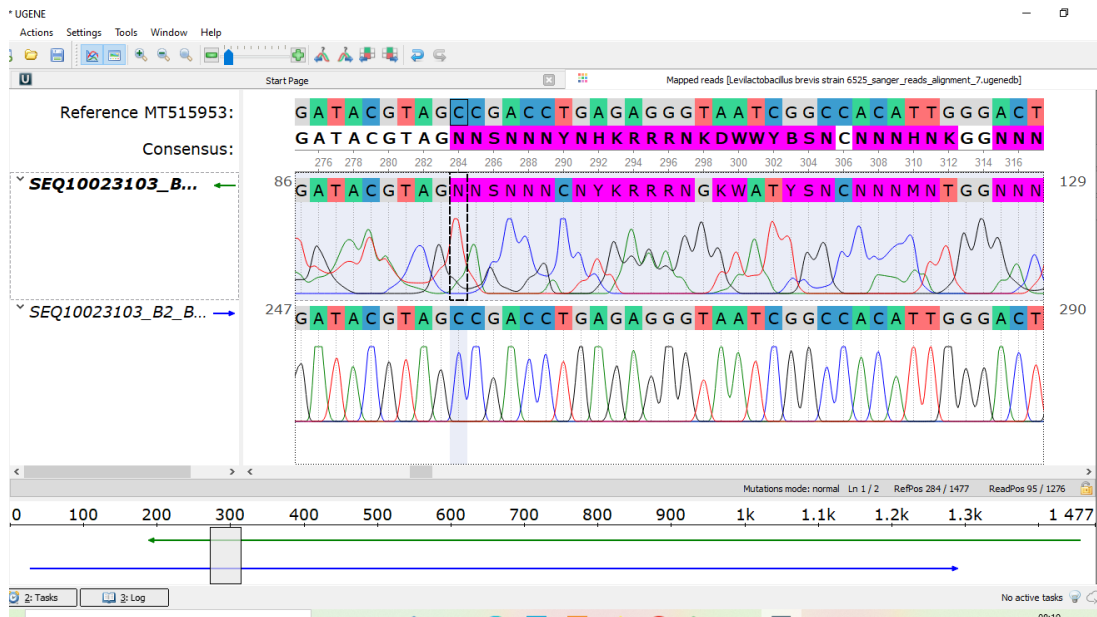


Figure 05 : Affichage de la séquence HM7 brute dans Unipro UGENE avant correction.

On remarque la présence de bases ambiguës (telles que N, R, Y...) et de pics irréguliers dans le chromatogramme, notamment aux extrémités, nécessitant une correction manuelle pour assurer la fiabilité des analyses ultérieures.

I.4.3.2 Analyse de la séquence par BLASTn :

Après la correction manuelle de la séquence d'ARN 16 S (nommée HM7) à l'aide du logiciel Unipro UGENE, celle-ci a été enregistrée au format FASTA. Ce format commence toujours par une ligne d'identification précédée du symbole >, suivie des lignes contenant la séquence nucléotidique.

La séquence corrigée a ensuite été copiée depuis le fichier FASTA et soumise à l'outil BLASTn via le site officiel de NCBI.

: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch

Comme illustré dans la Figure 6, la séquence a été analysée en la collant dans le champ «Enter Query Sequence», sans modifier les paramètres par défaut (base de données : nt, algorithme : megablast, etc.), puis en cliquant sur le bouton BLAST pour lancer la recherche d'appariement.

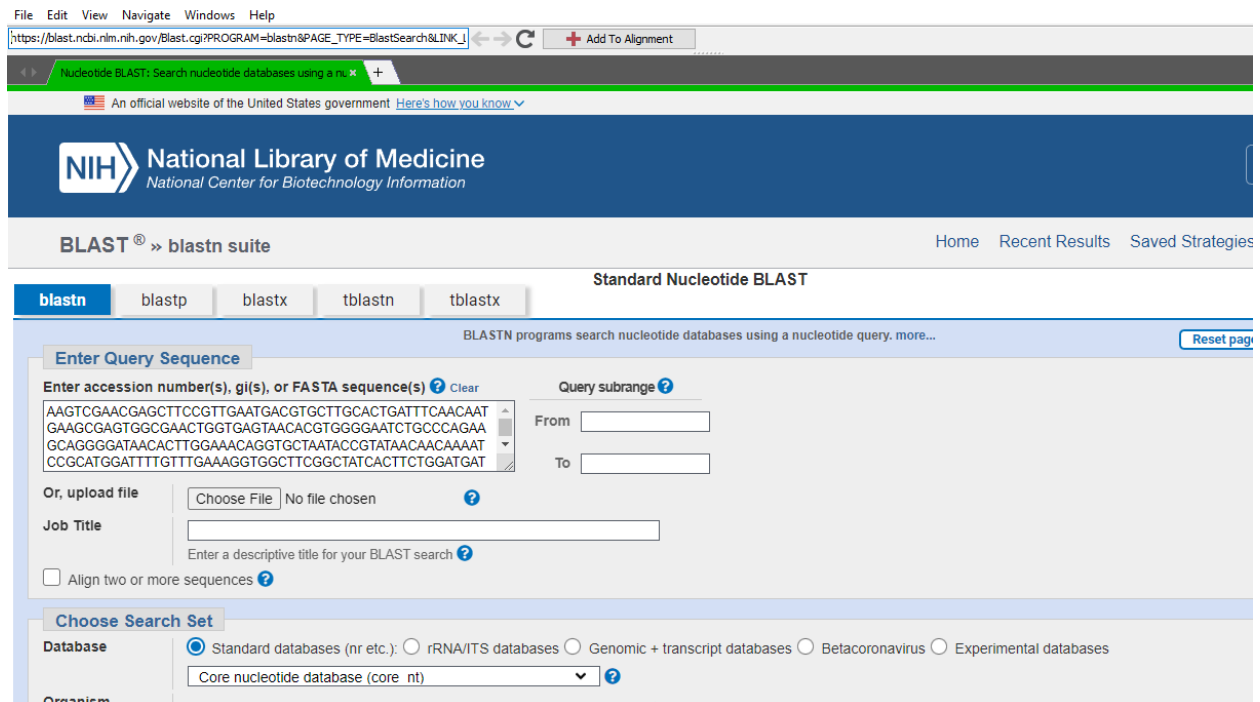


Figure 06 : Interface de l’outil BLASTn utilisée pour l’analyse de la séquence d’ARNr 16 S (source : NCBI).

L’outil BLASTn permet d’identifier les séquences en les comparant à une vaste base de données de séquences de référence, ce qui permet une identification préliminaire de l’organisme étudié (Johnson et al., 2022).

Les résultats ont affiché les alignements les plus proches, avec les pourcentages d’identité, les valeurs E (E-values) et les numéros d’accèsion (Accession Numbers).

I.3.3.3 Construction de l’arbre phylogénétique avec MEGA 12 :

Afin de déterminer les relations évolutives entre la souche étudiée HM7 et les séquences de référence, le logiciel MEGA version 12 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) a été utilisé. Ce logiciel constitue un outil puissant en bioinformatique, permettant l’alignement multiple de séquences (multiple sequence alignment) ainsi que la construction d’arbres phylogénétiques selon différentes méthodes statistiques telles que Maximum Likelihood, Neighbor-Joining, entre autres (Tamura et al., 2021).

L’analyse a commencé par l’accès à l’option Align > Edit/Build Alignment, où un nouvel alignement a été créé via Create a new alignment, en sélectionnant le type de séquences

ADN. La séquence corrigée HM7 a ensuite été insérée manuellement, suivie de 21 séquences de référence obtenues à partir de la base de données NCBI au format FASTA.

Après l'insertion, toutes les séquences ont été sélectionnées puis alignées à l'aide de l'outil intégré Muscle, en choisissant Align DNA, qui aligne les nucléotides selon leur similitude. Comme illustré dans la Figure 7, les séquences sont affichées dans une interface claire où les différences nucléotidiques apparaissent de manière visible. L'alignement obtenu a été sauvegardé sous format .meg pour une utilisation ultérieure.

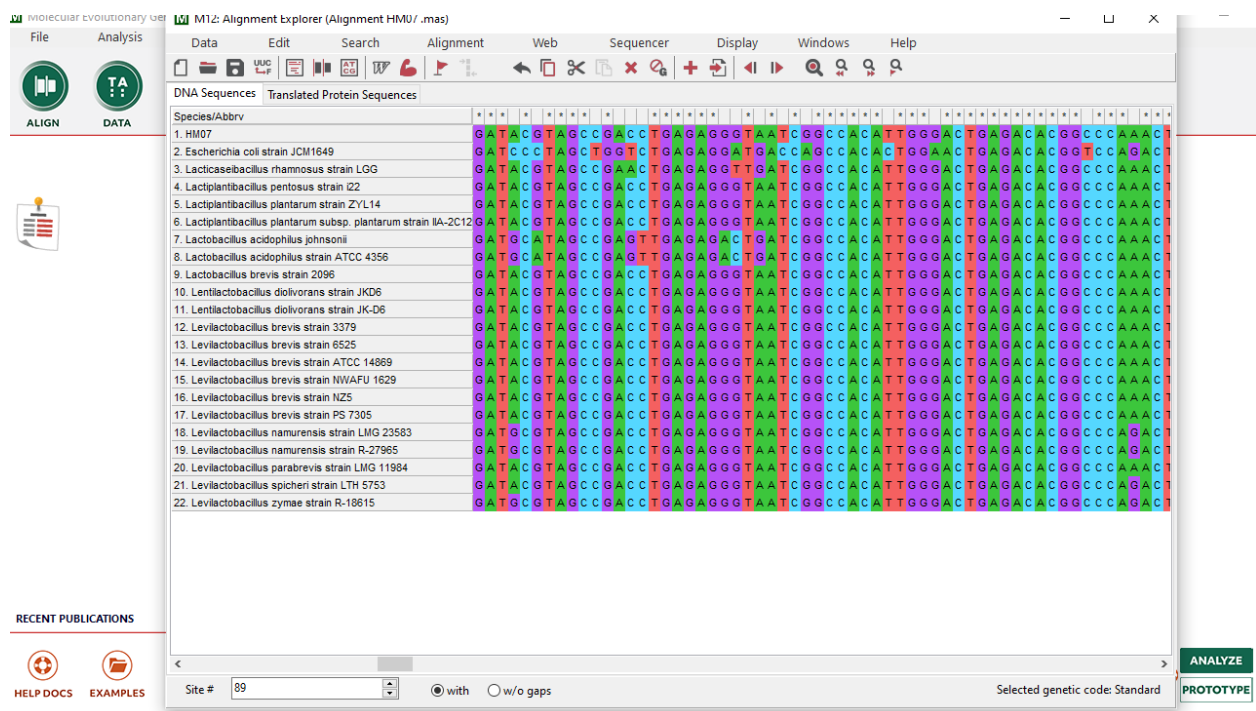


Figure 07 : Interface d'alignement multiple dans MEGA 12 montrant la séquence cible HM7 et les séquences de référence alignées via l'algorithme Muscle (type ADN).

La construction de l'arbre phylogénétique a été réalisée en accédant au menu Phylogeny, puis en sélectionnant Construct/Test Maximum Likelihood Tree. Les paramètres par défaut n'ont pas été modifiés, et l'arbre a été généré automatiquement puis affiché dans l'interface graphique de MEGA.

Cette procédure a permis de visualiser les relations évolutives entre les séquences de référence et de positionner la séquence cible HM7 dans un contexte taxonomique hypothétique.

Chapitre II

Résultats & discussion

II.1.Partie pratique :

Dans cette partie, nous présentons puis discutons les différents résultats obtenus au cours du travail expérimental, visant à atteindre les objectifs de l'étude et à confirmer les hypothèses proposées. Ces résultats incluent les données issues des essais microbiologiques, ainsi que des analyses moléculaires telles que la réaction en chaîne par polymérase (PCR), le séquençage génétique et les analyses bioinformatiques.

II.1.1.Réactivation de la souche:

Après incubation de la souche HM7 dans un bouillon MRS stérile pendant 24 h à 37 °C, suivie d'un repiquage sur gélose MRS, une croissance bactérienne visible a été observée après 24 à 48 heures d'incubation. Les colonies obtenues étaient de forme circulaire, de couleur blanche opaque et bien définies, ce qui indique que la souche a conservé sa viabilité après un stockage à 6 °C.

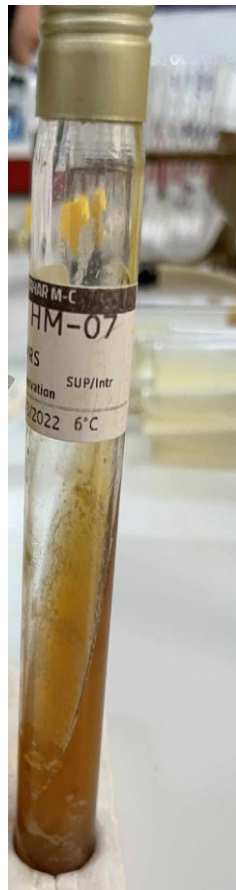


Figure 08 : Croissance de la souche HM7 sur gélose MRS après réactivation post-réfrigération à 6 °C.

Ce résultat met en évidence la capacité de réfrigération, ce qui est cohérent avec les propriétés connues des bactéries lactiques. En effet, selon Zhao et al. (2020), certaines souches de *Lactobacillus* peuvent survivre pendant des périodes prolongées à 4–8 °C, notamment grâce à des adaptations de leur membrane cellulaire.

Par ailleurs, Sánchez et al. (2018) ont rapporté que la reprise de croissance après stockage dépend fortement de la nature du milieu nutritif utilisé. Dans notre cas, le milieu MRS, riche en nutriments, a permis une réactivation efficace de la souche.

II.1.2. Identification des souches :

II.1.2.1. Caractères cultureux et morphologiques:

- **Étude macroscopique :** L'observation macroscopique des colonies de la souche HM7 cultivée sur gélose MRS a montré des caractères typiques des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* ou encore *Levilactobacillus* spp.. Après incubation à 37 °C pendant 24 à 48 heures, les colonies étaient de taille moyenne, de forme circulaire, avec des bords réguliers et un relief légèrement bombé. La surface était lisse et brillante, avec une pigmentation blanc crème (Figure 9) (Tableau1).



Figure 09 : Aspect macroscopique des colonies bactériennes de la souche (HM7) cultivées le milieu MRS.

Tableau 1 : Description macroscopique de la souche (HM7).

Taille	Forme	Contour	Relief	Surface	Couleur
moyenne	Circulaire	Régulier	légèrement bombé	lisse et brillante	Blanc crème

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Hemme et Foucaud-Scheunemann (2004), qui décrivent les colonies de *Lactobacillus* comme étant opaques, circulaires, de couleur crème à blanchâtre sur milieu MRS. De même, Zhong et al. (2019) ont observé des colonies similaires chez des souches isolées de *Lactobacillus brevis* provenant de produits fermentés.

- **Étude microscopique :** L'observation au microscope optique, après coloration de Gram, a permis de visualiser les cellules bactériennes de la souche HM7. Ces dernières se présentent sous forme bacillaire (bâtonnets), disposées en amas ou parfois alignées, et colorées en violet, indiquant une réaction Gram positif. Ce résultat suggère que la paroi cellulaire est riche en peptidoglycane, ce qui explique la rétention du cristal violet lors de la coloration.

Ces caractéristiques morphologiques sont typiques des bactéries à Gram positif, notamment de nombreuses espèces du genre *Lactobacillus* et *Bacillus*, mais aussi d'autres genres de bactéries lactiques comme *Leuconostoc*, *Pediococcus*, et *Enterococcus* (figure 10 et Tableau 2).

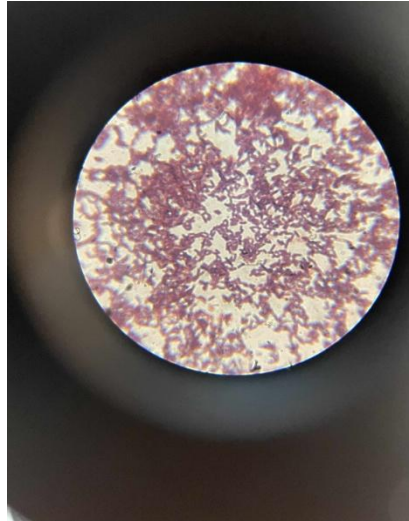
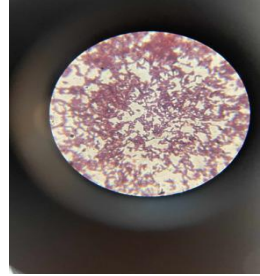


Figure 10 : Aspect microscopique de l'isolat bactérien après la coloration de Gram ($\times 6000$).

Tableau 2 : Description microscopique de la souche HM.

Souche	Gram	Morphologie	Observation microscopique
HM7	Positif (+)	Bacilles	

Nos observations concordent avec celles rapportées par Felis et Dellaglio (2007), qui décrivent les cellules de *Lactobacillus* comme étant généralement en bâtonnets, Gram positif, et souvent groupées. De même, Hammes et Hertel (2009) ont observé que la disposition cellulaire peut varier selon les conditions du milieu, et que l'agencement en paires ou chaînes est courant chez les *lactobacilles*.

II.1.2.2. Test de catalase :

Le test de catalase effectué sur la souche HM7 s'est révélé négatif, aucune formation de bulles n'a été observée après l'ajout du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce résultat suggère l'absence de l'enzyme catalase chez cette souche, ce qui est caractéristique des bactéries lactiques, notamment du genre *Lactobacillus*, connues pour être catalase négative.

Ce comportement est généralement lié au fait que ces bactéries se développent en conditions anaérobies ou microaérophiles, où la présence de l'enzyme catalase n'est pas essentielle pour neutraliser le peroxyde d'hydrogène. Le résultat obtenu est donc cohérent avec le profil physiologique d'une bactérie lactique (Figure 11).



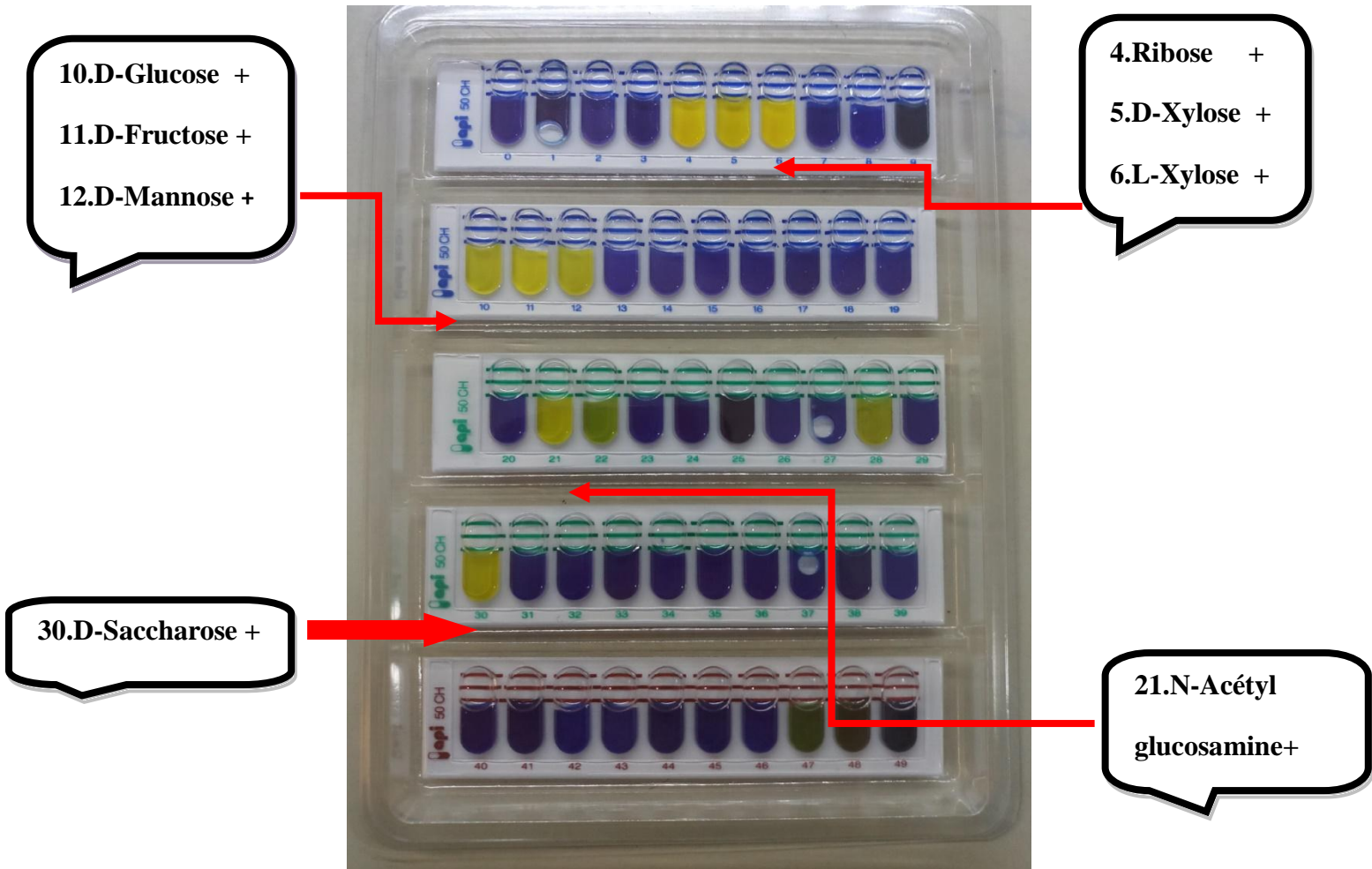
Figure 11 : Résultat du Test de catalase.

Les données obtenues dans notre étude sont similaires à celles rapportées par MacFaddin (2000), qui a souligné que la majorité des espèces de *Lactobacillus* ne produisent pas de catalase. De même, Kandler et Weiss (1986) ont mentionné que l'absence de catalase constitue un critère important dans l'identification des bactéries lactiques.

II.1.2.3. Identification dans la galerie API 50 CH :

L'analyse de la bandelette API 50 CH a permis d'évaluer la capacité fermentaire de la souche bactérienne HM7 vis-à-vis de 50 substrats glucidiques. Après incubation à 30 °C pendant 48 heures, 8 sucres ont été fermentés, comme en témoigne le virage de couleur du milieu de violet à jaune, indiquant une acidification due à la production d'acide lactique.

Les résultats détaillés sont présentés dans le tableau 3 et le figure 12.



Figur 12 : Résultats du test API 50 CH pour la souche HM7.

Tableau 3 : Résultats du test API 50 CH pour la souche HM7.

N°	Sucre testé et Résultat
0	Glycérol -
1	Erythritol -
2	D-Arabinose -
3	L-Arabinose -
4	Ribose +
5	D-Xylose +
6	L-Xylose +
7	D-Adonitol -
8	Méthyl-β-D-xylopyranoside -
9	D-Galactose ±
10	D-Glucose +

11	D-Fructose	+
12	D-Mannose	+
13	L-Sorbose	-
14	L-Rhamnose	-
15	Dulcitol	-
16	Inositol	-
17	D-Mannitol	-
18	D-Sorbitol	-
19	Méthyl- α -D-mannopyranoside	-
20	Méthyl- α -D-glucopyranoside	-
21	N-Acétyle-glucosamine	+
22	Amygdaline	\pm
23	Arbutine	-
24	Esculine	-
25	Salicine	\pm
26	D-Cellobiose	-
27	D-Maltose	-
28	D-Lactose	-
29	D-Melibiose	-
30	D-Saccharose (sucrose)	+
31	D-Trehalose	-
32	Inuline	-
33	D-Mélézitose	-
34	D-Raffinose	-
35	Amidon (Starch)	-
36	Glycogène	
37	Xylitol	-
38	β -Gentiobiose	\pm
39	D-Turanose	-
40	D-Lyxose	\pm
41	D-Tagatose	\pm
42	D-Fucose	-
43	L-Fucose	-
44	D-Arabitol	\pm
45	L-Arabitol	\pm
46	Gluconate	-

47	2-Cétogluconate	±
48	5- Cétogluconate	±
49	Contrôle (sans sucre)	_

Ces résultats indiquent un profil métabolique restreint, typique de certaines espèces de la famille des *Lactobacillaceae*, notamment les genres *Lactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*. La capacité à fermenter des sucres comme le glucose, la cellobiose et la salicine est couramment observée chez ces bactéries.

En revanche, l'incapacité à fermenter le D-sorbitol, le L-arabinose et le D-adonitol permet d'écartier certaines espèces comme *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, et *Weissella confusa*, qui présentent un spectre fermentaire plus large.

Tableau 4 : Comparaison des résultats de fermentation de la souche HM7 avec ceux rapportés pour d'autres souches similaires.

Interprétation	Cellobiose	Arabinose	Sorbitol	Glucose	Espèce/Souche	Étude
Profil restreint, type LAB	+	-	-	+	Inconnue (présumée lactique)	Notre étude (HM7)
Résultats similaires à HM7	+	-	-	+	<i>Levilactobacillus brevis</i>	El-Baradei et al. (2007)
Spectre plus large, à écartier	+	+	+	+	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Lee et al. (2005)
Spectre large, différent de HM7	-	+	+	+	<i>Weissella confusa</i>	Nguyen et al. (2021)

La comparaison avec d'autres travaux confirme que la souche HM7 présente un profil métabolique proche de celui de *Levilactobacillus brevis*, identifié par El-Baradei et al. (2007) dans du fromage Domiati, un produit laitier fermenté traditionnelle égyptien. En revanche, les

espèces telles que *Lactobacillus fermentum* ou *Weissella confusa*, étudiées respectivement par Lee et al. (2005) et Nguyen et al. (2021), montrent une capacité à fermenter un plus grand nombre de substrats, ce qui les rend moins probables dans notre cas.

Ces différences peuvent s'expliquer par des variations génétiques inter-espèces ou intra-espèces, ou encore par des conditions environnementales influençant l'expression enzymatique (Hammes & Hertel, 2009).

Par conséquent, ces données biochimiques, en association avec les données morphologiques, physiologiques et moléculaires (comme le séquençage 16 S), contribuent à renforcer l'hypothèse d'une appartenance de HM7 au genre *Levilactobacillus*, avec une orientation probable vers *Lactobacillus brevis*.

II.1.3. Outils et procédures moléculaire :

II.1.3.1. Extraction de l'ADN bactérien:

L'extraction de l'ADN génomique de la souche bactérienne HM7 a permis d'obtenir un culot blanc visible après centrifugation. Cet aspect visuel indique la présence d'une quantité suffisante d'ADN, traduisant l'efficacité du protocole utilisé pour la lyse cellulaire et la libération du matériel génétique.

Des résultats similaires ont été rapportés par Pogacic, Gaspersic et Matijasic (2022) lors de l'extraction de l'ADN chez *Levilactobacillus brevis*, où un culot blanc dense a également été obtenu en utilisant un protocole basé sur la lyse enzymatique et chimique.

De même, Tamang, Watanabe et Holzapfel (2016) ont mentionné que la pureté et la visibilité du culot d'ADN sont des indicateurs fiables de la réussite de l'extraction chez les bactéries lactiques.

II.1.3.2. Électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose:

L'électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % effectuée sur l'échantillon HM7 a révélé une bande unique, nette et bien définie, positionnée juste au-dessus de la bande de 750 pb du marqueur de poids moléculaire. Cela permet d'estimer la taille du fragment amplifié à environ 850 à 900 pb, ce qui suggère une amplification partielle du gène ARNr 16 S (Figure 13).

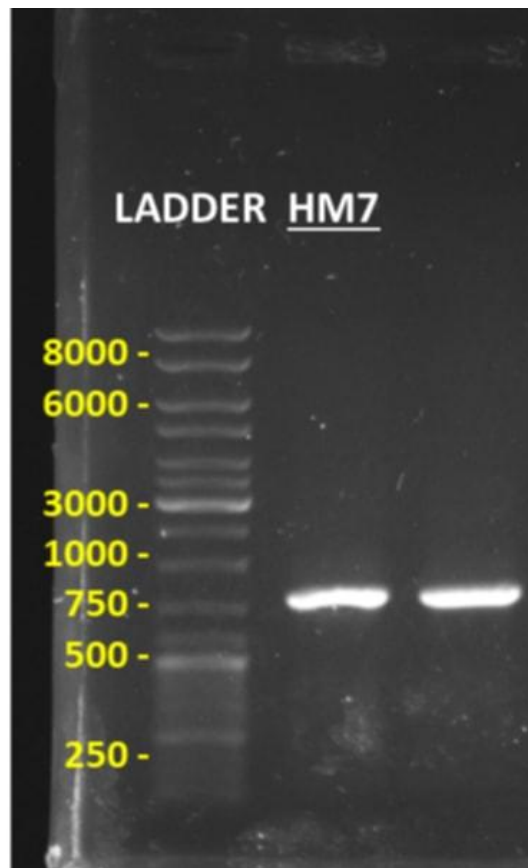


Figure 13 : Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose du produit PCR du gène ARNr 16 S de la souche HM7.

Ce résultat est cohérent avec la majorité des études ayant ciblé une ou plusieurs régions variables (V1–V3, V3–V4, ou V4–V5) de ce gène pour l'identification moléculaire des bactéries lactiques, notamment chez les genres *Lactobacillus* et *Levilactobacillus* (Clarridge, 2004).

Études similaires :

Dans une étude menée par Heeney, Gareau et Marco (2018) sur la séquence du gène 16 S des rRNA isolats de *Lactobacillus plantarum*, une bande unique de ~900 pb a été obtenue lors de l'amplification partielle du gène 16 S rRNA. De même, Wuyts, Wittouck et De Vuyst (2017) ont utilisé des amorces universelles pour amplifier un fragment de 850 pb du gène 16S chez des souches de *Levilactobacillus brevis* issues de produits fermentés, avec des résultats électrophorétiques très similaires.

À l'inverse, Kim, Shin et Park (2019) ont rapporté des produits secondaires et des bandes multiples lors de l'amplification du gène 16S chez des isolats contaminés par de l'ADN environnemental, ce qui souligne l'importance de la pureté de l'échantillon initial.

II.1.3.3 Réaction de PCR du gène ARNr 16 S :

La réaction de PCR effectuée sur l'ADN extrait de la souche bactérienne HM7 a permis d'amplifier un fragment estimé entre 850 et 900 pb, comme le montre la bande nette observée lors de l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % (Figure 7). Ce fragment correspond à une amplification partielle du gène ARNr 16S, ciblant principalement des régions variables utilisées pour l'identification bactérienne.

L'absence de bandes secondaires ou de produits non spécifiques témoigne d'une réaction spécifique et exempte de contamination, ce qui confirme la qualité de l'ADN extrait et l'efficacité du protocole PCR utilisé.

Études similaires :

Des résultats similaires ont été rapportés dans plusieurs études portant sur l'identification des bactéries lactiques par PCR. Heeney, Gareau et Marco (2018) ont amplifié un fragment de ~900 pb chez *Lactobacillus plantarum*, tandis que Wuyts et al. (2017) ont observé des bandes uniques nettes de 850 pb chez *Levilactobacillus brevis*.

En revanche, Kim, Shin et Park (2019) ont décrit des réactions non spécifiques et des bandes multiples causées par une qualité médiocre de l'ADN ou une contamination croisée, soulignant l'importance d'un bon contrôle de qualité.

II.1.3.4. Séquençage de l'ADN:

Le séquençage du gène ARNr 16 S de la souche bactérienne HM7 a été réalisé selon la méthode de Sanger, au laboratoire Eurofins Genomics (Allemagne), après purification préalable du produit PCR.

L'utilisation des amorces universelles 27F(Forward) et 1492R(Reverse) a permis d'amplifier une large portion du gène cible, assurant ainsi une couverture quasi-complète du gène ARNr 16S, ce qui augmente la précision de l'identification. La purification des produits PCR a contribué à éliminer les amorces, enzymes et nucléotides résiduels, garantissant une lecture claire et fiable lors du séquençage.

À ce stade, les résultats de séquençage sont en cours d'analyse bioinformatique, notamment à travers l'alignement de séquences, l'analyse de qualité et la recherche d'homologie par BLAST. Cette étape permettra de déterminer l'identité moléculaire de la souche et d'évaluer son proche parentage phylogénétique avec d'autres espèces bactériennes.

Études comparatives

Des études similaires ont rapporté le recours aux amorces 27F/1492R dans l'identification de bactéries lactiques. Par exemple, Berthier et Ehrlich en 1999 ont utilisé ces amorces pour caractériser des espèces de *Lactobacillus* dans le fromage, avec une couverture moyenne de 1400 pb. De même, Watanabe et Fujimoto et Sasamoto et Dugersuren et Tumursukh et Demberel en 2013 ont identifié *Levilactobacillus brevis* à partir d'aliments fermentés grâce à cette stratégie.

En revanche, Zheng et Wittouck et Salvetti et Franz et Harris et Mattarelli en 2020 ont signalé que certaines amorces pouvaient générer des séquences de qualité inférieure si la purification n'était pas rigoureuse, entraînant des lectures floues ou des séquences partielles. Cela met en évidence l'importance d'un protocole de purification fiable avant l'étape de séquençage.

II.2.Partie Bioinformatique :

Cette partie présente les résultats obtenus à partir de l'analyse bioinformatique du segment de la séquence de l'ADN du gène ARNr 16 S de la bactérie lactique étudiée.

Les étapes comprennent la correction du chromatogramme, l'identification de la bactérie par BLASTn, la génération de sa fiche d'identité, ainsi que la construction de l'arbre phylogénétique.

II.2.1 Préparation et correction de la séquence HM7 :

Suite à l'obtention de la séquence brute du gène ARNr 16 S de l'isolat bactérien par la méthode de séquençage Sanger, les lectures forward et reverse ont été importées dans le logiciel Unipro UGENE. Un alignement initial a été effectué entre ces deux lectures afin de générer une séquence consensuelle. Celle-ci a ensuite été comparée à une séquence de référence (*Levilactobacillus brevis* souche 6525) pour détecter d'éventuelles divergences et affiner la qualité de la séquence.

L'analyse du chromatogramme a révélé une faible qualité de lecture aux extrémités, ce qui est typique des séquençages Sanger. Ce phénomène est souvent attribué à une baisse de la fidélité de lecture en début et fin de séquence, parfois amplifiée par la présence des amorces. En plus de cela, plusieurs caractères ambigus ont été identifiés, tels que N, R, Y, K, représentant des bases incertaines. Par selon la nomenclature IUPAC (Union internationale de chimie pure et appliquée). exemple, R correspond à une base purique (A ou G), tandis que Y indique une base pyrimidique (C ou T).

Afin de corriger ces ambiguïtés, une inspection manuelle des chromatogrammes a été réalisée. Le bon recouvrement dans la région centrale des deux lectures a facilité cette correction, en s'appuyant sur les principes de complémentarité nucléotidique et la forme des pics fluorescents, comme le montre la Figure 14 ci-dessous.



Figure 14 : Segment de la séquence du gène ARNr 16 S après correction manuelle, illustrant l'élimination des ambiguïtés (codes IUPAC).

La figure ci-dessus montre un segment réel de la séquence brute, dans lequel les positions ambiguës ont été identifiées puis modifiées manuellement pour obtenir une séquence claire et exploitable. Cette intervention a permis de produire une version finale fiable de la séquence, enregistrée au format FASTA.

Cette séquence corrigée est essentielle pour les étapes bioinformatiques suivantes, telles que l'identification taxonomique par BLASTn ou l'établissement d'un arbre phylogénétique. Une erreur dans la séquence initiale pourrait en effet fausser l'interprétation des résultats, notamment en matière de classification évolutive.

Cette étape de correction constitue une phase cruciale dans toute démarche bioinformatique. Une séquence comportant des erreurs ou des bases ambiguës peut en effet fausser l'interprétation taxonomique ou les résultats phylogénétiques (Johnson et al., 2019). Les erreurs de lecture aux extrémités sont bien connues dans le séquençage Sanger et nécessitent souvent une intervention manuelle (Rodicio et Mendoza, 2004).

La méthode appliquée dans ce travail, bien qu'exigeante, repose sur une logique scientifique rigoureuse et garantit une meilleure fiabilité du fichier obtenu. La vérification manuelle du chromatogramme reste une étape indispensable dans les études utilisant le gène 16 S (Janda et Abbott, 2007).

De plus, la présence de caractères ambigus non corrigés peut entraîner des résultats erronés lors des recherches d'homologie avec BLAST, ou compromettre la construction d'arbres phylogénétiques fiables (Tremblay et al., 2015). Ce travail souligne ainsi l'importance de combiner la précision humaine avec les outils bioinformatiques pour assurer l'exactitude des analyses génétiques.

II.2.2. Analyse de la séquence par BLASTn:

L'analyse de la séquence du gène ARNr 16 S de la souche HM7 a été réalisée à l'aide de l'outil BLASTn du NCBI, en utilisant les paramètres standards, à savoir la base de données « nt » (séquences nucléotidiques) et l'algorithme « megablast », conçu pour détecter les similitudes élevées entre séquences proches.

Cette recherche a permis une première identification moléculaire précise de la souche, en générant des résultats d'alignement significatifs, présentés dans le tableau suivant.

Tableau 5 : Résumé des résultats d’alignement BLASTn.

Paramètre	Valeur
Pourcentage d’identité	99,93 %
Couverture de la requête	100 %
Valeur E (E-value)	0,0
Max Score	2 647
Total Score	13 214
Longueur du génome (Accession)	2 449 247 pb (CP165720.1)
Organisme identifié	<i>Levilactobacillus brevis</i> (NS2301G3)

Ces valeurs traduisent un alignement quasi parfait entre la séquence analysée et le génome de référence. La valeur E nulle, le pourcentage d’identité supérieur à 99 %, ainsi que la couverture totale de la requête confirment sans ambiguïté que la souche HM07 appartient à l’espèce *Levilactobacillus brevis*.

Les résultats concordent avec la littérature qui situe fréquemment *L. brevis* dans des matrices végétales ou laitières fermentées, où cette espèce contribue à l’acidification, à la production d’arômes et à la protection microbiologique du produit (Choi & Lee, 2022 ; Wuyts et al., 2017). Le gène 16 S reste une référence fiable pour ce type d’identification, à condition que la séquence soit de haute qualité — ce qui est garanti ici grâce à la correction manuelle préalable (Janda & Abbott, 2007).

En pratique, la confirmation de *L. brevis* ouvre des perspectives d'exploitation biotechnologique : valorisation comme starter de fermentation, formulation de probiotiques ou amélioration de la conservation de denrées végétales. Des analyses complémentaires (génomique comparative, tests phénotypiques ciblés) permettraient de caractériser plus finement le potentiel technologique de la souche HM7.

II.2.3 Fiche d'identité de la souche bactérienne identifiée :

Pour compléter l'identification moléculaire, une fiche synthétique de la souche a été établie à partir des données issues du résultat BLASTn. Ce tableau regroupe les caractéristiques génomiques, taxonomiques et géographiques de l'organisme identifié

Tableau 6 : Fiche d'identité de la bactérie lactique étudiée, *Levilactobacillus brevis* (souche NS2301G3).

Élément	Détails
Nom scientifique	<i>Levilactobacillus brevis</i>
Souche (Strain)	NS2301G3
Définition	Génome complet — chromosome circulaire
Accession NCBI	CP165720.1
Locus	CP165720 — 2 449 247 pb — (ADN circulaire)
Type moléculaire	ADN génomique
Pourcentage d'identité (BLAST)	99,93 %
Couverture de la requête	100 %
Source d'isolement	Kimchi (aliment fermenté)

Origine géographique	Gwangju, Corée du Sud
Date de collecte	22/10/2021
Taxonomic ID (NCBI)	1580

II.2.3.1. Classification taxonomique la bactérie lactique étudiée:

- Domaine : *Bacteria*
- Phylum : *Bacillota*.
- Classe : *Bacilli*.
- Ordre : *Lactobacillales* .
- Famille : *Lactobacillaceae*.
- Genre : *Levilactobacillus*.
- Espèce : *Levilactobacillus brevis*.

Cette fiche d'identité permet de renforcer l'identification moléculaire de l'isolat HM7, obtenue par alignement avec la souche *L. brevis* NS2301G3. Le pourcentage d'identité et la couverture maximale sont conformes aux seuils reconnus pour une assignation précise au niveau de l'espèce (Janda & Abbott, 2007).

L'isolement initial de cette souche à partir de Kimchi, un aliment fermenté d'origine coréenne, illustre bien l'environnement naturel et fonctionnel de *L. brevis*. Ce genre est couramment associé aux produits fermentés végétaux, notamment grâce à ses capacités métaboliques telles que la production d'acide lactique, la modulation du pH, ou la synthèse d'arômes (Choi & Lee, 2022).

De plus, la répartition géographique (Corée du Sud) et les caractéristiques génomiques (chromosome circulaire complet, ADN génomique de 2,45 Mb) fournissent un contexte écologique et évolutif utile pour mieux comprendre le potentiel technologique de la souche. Cela rejoint les travaux de Wuyts et al. (2017), qui ont mis en évidence l'importance de la diversité intra-espèce dans le genre *Levilactobacillus* pour la sélection de souches fonctionnelles.

En parallèle, des recherches récentes montrent que certaines souches de *L. brevis* présentent des propriétés probiotiques remarquables, telles qu'une résistance accrue à l'environnement intestinal, la production de substances antimicrobiennes, et une action immunomodulatrice (Zhao et al., 2021).

Ainsi, cette caractérisation complète de la souche NS2301G3, sur le plan génomique, fonctionnel et taxonomique, constitue une base solide pour une éventuelle valorisation industrielle, notamment dans le domaine agroalimentaire ou pharmaceutique.

II.2.4. Construction de l'arbre phylogénétique avec MEGA 12:

L'arbre phylogénétique de la souche HM7 a été construit à partir de la séquence du gène ARNr 16 S à l'aide du logiciel MEGA version 12, en appliquant la méthode du Maximum de Vraisemblance (Maximum Likelihood). Un ensemble de souches de référence appartenant à la famille *Lactobacillaceae* a été sélectionné afin de déterminer avec précision la position phylogénétique de la souche analysée.

L'analyse révèle que HM7 se regroupe clairement au sein d'un clade contenant des souches de *Levilactobacillus brevis*, avec une valeur de bootstrap supérieure à 90 %, ce qui traduit une forte proximité génétique et renforce l'identification préliminaire obtenue par BLASTn (Janda & Abbott, 2007). L'arbre montre également une séparation nette entre les différents genres de la famille, notamment *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, et *Levilactobacillus*, chacun formant un groupe monophylétique soutenu par des valeurs de bootstrap comprises entre 86 % et 97 %, ce qui indique la robustesse de la topologie obtenue (Wuyts et al., 2017).

Pour enracer l'arbre et mieux interpréter les relations évolutives, *Escherichia coli* a été utilisée comme groupe externe (outgroup) un choix courant dans les analyses phylogénétiques bactériennes, car cette espèce appartient à un phylum distinct et facilite l'orientation des divergences (Patel, 2001).

La Figure 16 ci-dessous illustre l'arbre phylogénétique obtenu, mettant en évidence les relations évolutives entre la souche HM7 et les autres espèces représentatives de la famille *Lactobacillaceae*.

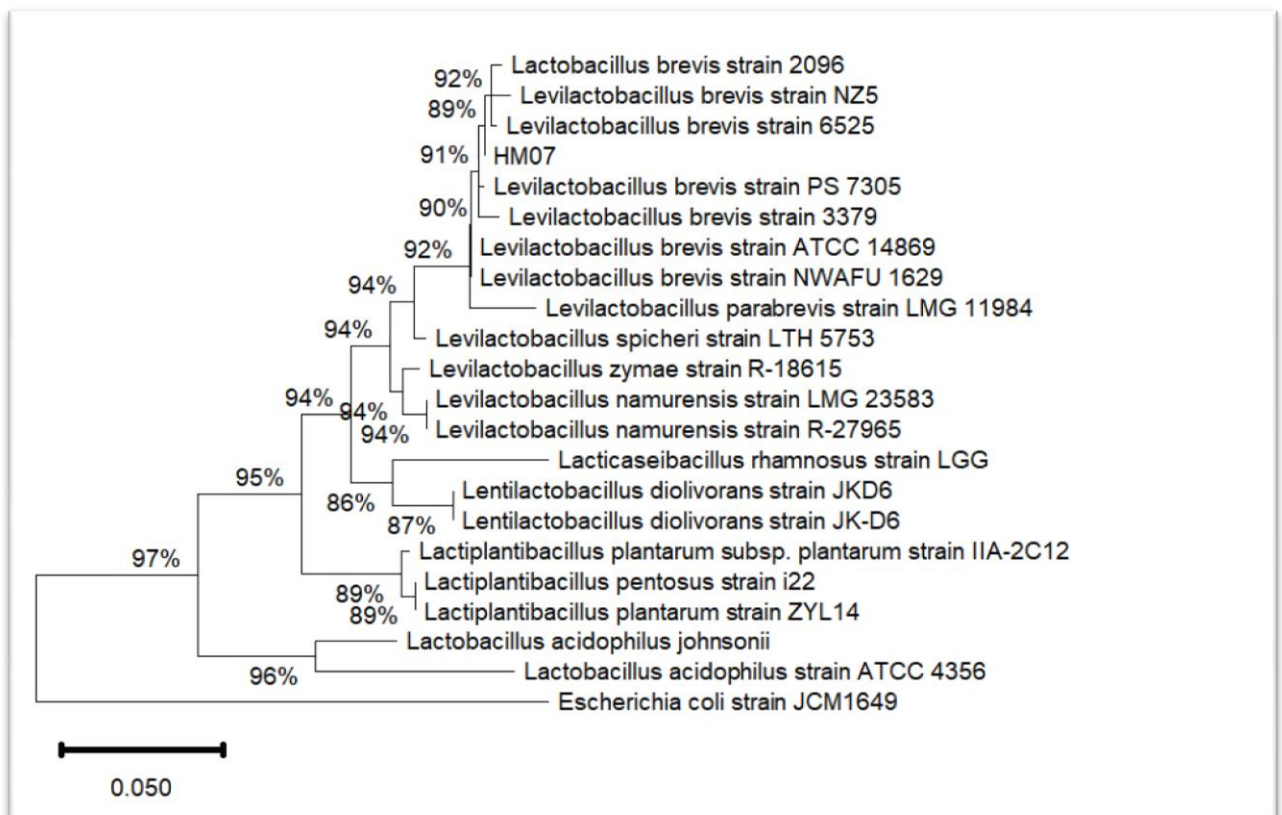


Figure 15 : Arbre phylogénétique construit selon la méthode du Maximum de Vraisemblance à partir de la séquence du gène ARNr 16S.

La figure 15 illustre clairement la structure de l'arbre phylogénétique, soulignant les relations évolutives entre la souche HM7 et les autres espèces représentatives de la famille *Lactobacillaceae*. Ces résultats confirment que l'analyse du gène ARNr 16 S reste une méthode de référence pour l'identification bactérienne et l'exploration des relations taxonomiques à un niveau élevé de résolution (Choi & Lee, 2022).

Conclusion

Conclusion :

L'objectif principal de ce travail était d'identifier une souche bactérienne isolée à partir d'un produit fermenté traditionnel, en adoptant une approche combinée entre les analyses et les outils de bioinformatique. À travers une série d'expérimentations en laboratoire, la souche HM7 a été caractérisée à plusieurs niveaux.

Sur le plan macroscopique, les colonies cultivées sur gélose MRS présentaient un aspect opaque, de couleur blanche, circulaire et bien délimitée, ce qui correspond aux caractéristiques classiques des bactéries lactiques. L'observation microscopique a révélé des cellules de forme bacillaire, à Gram positif, souvent regroupées, ce qui renforce leur appartenance à ce groupe bactérien. L'analyse biochimique *via* la galerie API 50 CH a mis en évidence un profil métabolique proche du genre *Levilactobacillus*. Par ailleurs, l'analyse partielle du gène ARNr 16S, suivie du séquençage et du traitement bioinformatique (BLAST et phylogénie), a confirmé cette appartenance, montrant une forte similarité avec une souche référencée de *Levilactobacillus brevis*.

La complémentarité entre les données phénotypiques et bioinformatiques s'est avérée efficace, permettant une identification taxonomique plus précise qu'une approche unique. Ce travail souligne ainsi l'importance d'une méthodologie intégrée pour l'analyse de souches bactériennes isolées de milieux naturels. La souche *L. brevis* étudiée présente un intérêt biotechnologique important en raison de ses propriétés probiotiques, de sa capacité à produire des composés antimicrobiens naturels (bactériocines), et de son rôle dans la fermentation alimentaire. Son application pourrait donc s'étendre à divers domaines tels que la santé publique, l'industrie agroalimentaire, la nutrition fonctionnelle ou encore la pharmaceutique.

À travers ce travail, nous avons appris à étudier les caractéristiques morphologiques et biochimiques de la bactérie HM en utilisant des tests simples tels que la catalase et l'API50CH. Nous avons également acquis une expérience dans les techniques de biologie moléculaire, allant de l'extraction de l'ADN à l'amplification et au séquençage du gène ARNr 16S, puis à l'analyse des résultats à l'aide d'outils bioinformatiques tels que BLAST et la construction d'un arbre phylogénétique.

Cela nous a permis de comprendre l'importance de combiner les observations phénotypiques et les analyses moléculaires pour une identification et une classification plus précises des bactéries.

Pour approfondir cette étude, il serait pertinent, dans les perspectives futures, d'évaluer les propriétés fonctionnelles de la souche HM7, telles que sa tolérance à l'acidité gastrique, son adhésion à l'épithélium intestinal, ou encore son effet inhibiteur sur les bactéries pathogènes. Des analyses génomiques plus poussées pourraient également être envisagées pour mieux comprendre son potentiel probiotique. Enfin, l'incorporation de cette souche dans des produits alimentaires expérimentaux et l'évaluation de ses performances fermentaires permettraient de confirmer sa valeur technologique et industrielle.

Références bibliographiques

Référence :

- American Society for Microbiology. (2024). Gram Staining Protocol. ASM Protocols
- Arveiler, B. (2018). Lagénomique en diagnostic de routine.médecine/sciences, 34, 41-42.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S., von Wright, A., & Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (3rd ed., pp. 1–66). CRC Press, Boca Raton.
- Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., & Ibrahim, S. A. (2020). Lactic acid bacteria: Food safety and human health applications. *Dairy*, 1(3), 202–232.
- Bansal, A., & Gupta, R. (2017). An Insight of Biological Databases Used in Bioinformatics. In *Bioinformatics: A Practical Guide for the Life Scientist* (pp. 1–15). Springer.
- Barka, I., & Khakha, H. S. (2021). Étude et caractérisation des bactéries lactiques de S'men élaboré à partir du lait de chamelle (Mémoire de Master académique, Université Kasdi Merbah Ouargla). Université Kasdi Merbah, Ouargla.
- Baxevanis, A. D., & Bateman, A. (2015). The importance of biological databases in biological discovery. *Current Protocols in Bioinformatics*, 50, 1.1.1–1.1.8.
- Berthier, F., & Ehrlich, S. D. (1999). Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 5324–5327.
- Cano, I., Maeda, Y., & Kania, R. (2018). Challenges and limitations in integrating omics data for personalized medicine. *Current Opinion in Systems Biology*, 7, 36–42.
- Cappuccino, J. G., & Welsh, C. (2019). *Microbiology: A Laboratory Manual* (12th ed.). Pearson Education.
- Choi, J., & Lee, S. (2022). Bioinformatics and its role in the study of the evolution and probiotic potential of lactic acid bacteria. *Food Science and Biotechnology*, 31(2), 145–154.
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862.

- Deng, Y., Wang, H., Hamamoto, R., Schaffer, D., & Duan, S. (2015). Functional genomics, genetics, and bioinformatics. *BioMed Research International*, 2015, Article 184824.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A., & Ogier, J. C. (2007). Biodiversity of bacterial strains in traditional Egyptian dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 295–303.
- Fadanka, S., Shalo, M. M., & Mowoh, N. (2022). Preparation of PBS Solution V.2.
- Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2), 44–61.
- Gauthier, J., Vincent, A. T., Charette, S. J., & Derome, N. (2019). A brief history of bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*, 20(6), 1981–1996.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2009). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *Ecology of Lactic Acid Bacteria* (pp. 234–298). Springer.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2009). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In M. Dworkin (Ed.), *The Prokaryotes* (pp. 320–403).
- Han, J., Xie, W., Song, Y., Liu, T., & Zhang, Y. (2020). CODE-seq: An integrated method for copy number variation and exome sequencing analysis in a single workflow. *Genome Biology*, 21(1), 142.
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8.
- Heeney, D. D., Gareau, M. G., & Marco, M. L. (2018). Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride?. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 140–147.
- Heeney, D. D., Gareau, M. G., & Marco, M. L. (2018). Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride?. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 140–147.
- Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467–494.
- 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). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement

on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514.

- Huang, S., & Li, B. (2024). Common Methods for Phylogenetic Tree Construction and Their Implementation in R. *Bioengineering*, 11(5), 480.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764.
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., ... & Nelson, K. E. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 5029.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2022). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W293–W300.
- Kämpfer, P., & Glaeser, S. P. (2012). Prokaryotic taxonomy in the sequencing era—the polyphasic approach revisited. *Environmental Microbiology*, 14(2), 291–317.
- Kandler, O., & Weiss, N. (1986). Regular, nonsporing Gram-positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 2, pp. 1208–1234). Williams & Wilkins.
- Kashyap, H., Ahmed, H. A., Hoque, N., Roy, S., et Bhattacharyya, D. K. (2015). Analyse des Big Data en bioinformatique : une perspective d'apprentissage automatique. ArXiv preprint : 1506.05101.
- Kiely, P., & O'Brien, S. (2020). Rapid, low-cost bacterial genomic DNA extraction using SDS and ethanol precipitation. *Journal of Microbiological Methods*, 173, 105925.
- Kim, M. K., Shin, Y. J., & Park, J. S. (2019). Non-specific amplification in 16S rRNA gene PCR caused by environmental DNA contamination in DNA extraction kits. *Journal of Microbiological Methods*, 161, 85–88.
- Kim, M. K., Shin, Y. J., & Park, J. S. (2019). Non-specific amplification in 16S rRNA gene PCR caused by environmental DNA contamination in DNA extraction kits. *Journal of Microbiological Methods*, 161, 85–88.
- König, H., Fröhlich, J. (2009). Lactic Acid Bacteria. In : König H., Uden G., Fröhlich J. (Eds), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Springer, Heidelberg, pp. 3–40.

- Laganà, A., Ferro, A., & Croce, C. M. (2015). Editorial: Bioinformatics of non-coding RNAs with applications to biomedicine: Recent advances and open challenges. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, Article 156.
- Laperle, J. (2019). Développement d'outils et méthodes pour l'analyse de données épigénétiques (Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke). Université de Sherbrooke.
- Lee, J. Y., Kim, C. J., Kunz, B., & Franke, C. (2005). Identification of *Lactobacillus fermentum* strains by carbohydrate fermentation profiles and 16S rDNA sequencing. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(2), 298–303.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., & Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework . *Nucleic Acids Research*, 43 (W1),W580-W584 .
- Li, Y., Huang, C., Ding, L., Li, Z., Pan, Y., et Gao, X. (2019). Apprentissage profond en bioinformatique : introduction, application et perspective à l'ère du big data. ArXiv preprint : 1903.00342.
- Liu, Y., Wang, Y., & Liu, Y. (2014). Application and mechanism of lactic acid bacteria in food fermentation. *Advances in Microbiology*, 4(5), 102–108.
- Lotel, S., Kawabata, M., & Nishibori, Y. (2017). Development of an MRS broth-based complete food-grade medium for *Lactobacillus gasseri* cultivation using food-grade yeast extract and bacteriocins produced by the bacteria. *Milk Science*, 66(1), 1–9.
- MacFaddin, J. F. (2000). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., & Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94–102.
- Mardis, E. R. (2017). DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nature Protocols*, 12(2), 365–368.
- Marson, F. A. L., Bertuzzo, C. S., & Ribeiro, J. D. (2013). Database tools in genetic diseases research. *Genomics*, 101(2), 75–85.
- Moeinzadeh, M.-H., Nazari, M., Rajabzadeh, G., & Ghasemi, Y. (2020). Cloud-based bioinformatics: opportunities and challenges. *Briefings in Bioinformatics*, 21(6), 1956–1971

- Mohammad, A. O., AlKurtany, A. E., & Hassan, A. A. (2020). Evaluation of API 20E system in fluorescent *Pseudomonas* identification from button mushroom *Agaricus bisporus* cultivation casing soil. *Notulae Scientia Biologicae*, 12(2), 258–263.
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, 22(8), 1255.
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, 22(8), 1255.
- Moniruzzaman, A. B. M., & Hossain, S. A. (2013). NoSQL database: New era of databases for big data analytics – Classification, characteristics and comparison. *International Journal of Database Theory and Application*, 6(4), 1–14.
- Montagne, L., Christin-Maitre, S., Canault, M., Boissel, N., & Nizard, J. (2018). CoDE-seq, un séquençage augmenté de l'exome entier, permet la détection précise des CNV et des mutations dans l'obésité mendélienne et la déficience intellectuelle. *Molecular Metabolism*, 18, 14–26.
- Mount, D. W. (2004). *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- National Center for Biotechnology Information. (2020). Nucleotide IUPAC code.
- Nguyen, H. T., Nguyen, D. A., Nguyen, T. T., Nguyen, M. L., & Phan, T. N. (2021). Characterization of *Weissella* spp. isolated from fermented foods. *Foods*, 10(3), 654.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & the UGENE team. (2018). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 34(5), 892–893.
- Palomo, J. L., López, M. M., García-Benavides, P., & Martínez-Molina, E. (2006). Evaluation of the API 50 CH and API ZYM systems for rapid characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 443–451.
- Patel, J. B. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*, 6(4), 313–321.
- Pogacic, T., Gaspersic, D., & Matijasic, B. B. (2022). Isolation and identification of lactic acid bacteria from fermented vegetables using culture-dependent and molecular approaches. *Microorganisms*, 10(5), 1056.

- Rodicio, M. R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245
- Roumpeka, D. D., Wallace, R. J., Escalettes, F., Fotheringham, I., & Watson, M. (2017). A review of bioinformatics tools for bio-prospecting from metagenomic sequence data. *Frontiers in Genetics*, 8, Article 23.
- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margolles, A. (2018). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods: Survival under gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 105, 872–879.
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Frisse, L., Pruitt, K. D., Schneider, V. A., Underwood, B. A., Yankie, L., & Karsch-Mizrachi, I. (2025). GenBank 2025 update. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D57–D60.
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2021). Advantages and limitations of quantitative PCR (qPCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(2), fiae257.
- Sousa, S. A., Leitão, J. H., Martins, R. C., Sanches, J. M., Suri, J. S., & Giorgetti, A. (2016). Bioinformatics applications in life sciences and technologies. *BioMed Research International*, 2016, Article 3603827.
- Steel, R. G. D., Torrey, J. G., & Dickey, J. F. (2016). Bioinformatics: an overview and its applications. *Briefings in Bioinformatics*.
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Shaw, K., Phillips, A. D., & Cooper, D. N. (2014). The Human Gene Mutation Database: Building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Human Genetics*, 133(1), 1–9.
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Shaw, K., Phillips, A., & Cooper, D. N. (2017). The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Human Genetics*, 136(6), 665–677.
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Shaw, K., Phillips, A., & Cooper, D. N. (2020). The Human Gene Mutation Database (HGMD): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. *Human Genetics*, 139(8), 1197–1207.

- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. Springer.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.
- Tapprich, W. E., Reichart, L., Simon, D. M., Duncan, G., McClung, W., & Pauley, M. A. (2020). An instructional definition and assessment rubric for bioinformatics instruction. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(1), 38–45.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2019). *Microbiology: An Introduction* (13th ed.). Pearson.
- Tremblay, J., Singh, K., Fern, A., Kirton, E. S., He, S., Woyke, T., ... & Langille, M. G. (2015). Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 6, 771.
- Uesaka, K., Oka, H., Kato, R., Kanie, K., Kojima, T., Tsugawa, H., Toda, Y., Horinouchi, T. (2022). Bioinformatics in bioscience and bioengineering: Recent advances, applications, and perspectives. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134(5), 363–373.
- Wafula, E. N., Kuja, J. O., Wekesa, T. B., & Wanjala, P. M. (2023). Isolation and Identification of Autochthonous Lactic Acid Bacteria from Commonly Consumed African Indigenous Leafy Vegetables in Kenya. *Bacteria*, 2(1), 1–20.
- Watanabe, K., Fujimoto, J., Sasamoto, M., Dugersuren, J., Tumursukh, C., & Demberel, S. (2013). Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in Airag and Tarag, traditional fermented milk products of Mongolia. *Food Microbiology*, 28(3), 449–458.
- Wuyts, S., Van Beeck, W., Oerlemans, E. F. M., Wittouck, S., & Lebeer, S. (2017). Large-scale phylogenomics of the *Lactobacillus casei* group highlights taxonomic inconsistencies and reveals novel clade-associated features. *BMC Genomics*, 18(1), 110.
- Wuyts, S., Wittouck, S., & De Vuyst, L. (2017). Comparative genome analysis of *Lactobacillus brevis* reveals its genetic potential for adaptation to different niches. *BMC Genomics*, 18(1), 267.
- Zhang, Y., Yang, H., Guo, L., & Liu, Y. (2021). A practical guide to agarose gel electrophoresis for DNA analysis. *Methods in Molecular Biology*, 2282, 89–98.

- Zhao, M., Zhang, Z., Huang, J., & Zeng, Z. (2021). Probiotic properties and potential mechanisms of action of *Levilactobacillus brevis* strains: A review. *Frontiers in Microbiology*, 12, 754447.
- Zhao, S., & Fung-Leung, W. P. (2020). Challenges and limitations in bioinformatics approaches for transcriptome data analysis. *Briefings in Bioinformatics*, 21(3), 885–901.
- Zhao, Y., Zhang, W., Wang, L., & Li, Y. (2020). Effects of cold storage on viability and membrane fatty acid composition of *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 76–85.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O’Toole, P. W. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera.... *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858.
- Zhong, Z., Hou, Q., Kwok, L. Y., Yu, Z., Zheng, Y., Sun, Z., & Zhang, H. (2019). Bacterial microbiota compositions of naturally fermented milk from the Tibetan Plateau of China. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 6025–6035.

Annexes

Annexe 1 : Matériel utilisé

Le matériel utilisé se compose de :

- Tubes à essai (10 et 15 mL).
- Boîtes de Pétri stériles (90 mm).
- Pipettes graduées (1, 5 et 10 mL).
- Micropipettes automatiques (20–200 µL et 100–1000 µL) avec cônes stériles.
- Erlenmeyers (100, 250 et 500 mL).
- Bêchers (50, 100 et 250 mL).
- Lames et lamelles. Tubes Falcon (15 et 50 mL).
- Flacons stériles (100–500 mL) Entonnoirs. Balance de précision.

Annexe 2 : Préparation des milieux de culture

a. Milieu MRS :

Étape	Procédure
1	Peser 55 g de poudre MRS déshydratée pour 1 L d'eau distillée.
2	Dissoudre la poudre dans ~900 mL d'eau distillée avec agitation et léger chauffage.
3	Compléter le volume final à 1 L avec de l'eau distillée.
4	Ajouter, si nécessaire, 15 g/L d'agar pour la préparation du milieu solide.
5	Stériliser à l'autoclave (121 °C, 15 min).

b. Tampon PBS :

Étape	Procédure
1	Peser les composants pour 1 L d'eau distillée : NaCl (8 g), KCl (0,2 g), Na ₂ HPO ₄ (1,44 g), KH ₂ PO ₄ (0,24 g).
2	Dissoudre dans ~900 mL d'eau distillée avec agitation.
3	Compléter le volume final à 1 L avec de l'eau distillée.
4	Stériliser à l'autoclave (121 °C, 15 min).

Annexe 3 : Coloration de Gram

Étape	Réactif	Temps d'application	Rôle
Fixation	Séchage à l'air + fixation à la flamme	-	Fixation des bactéries sur la lame
Coloration primaire	Violet de gentiane (cristal violet)	1 min	Colorer toutes les bactéries en violet
Mordançage	Lugol (iode)	1 min	Fixer le cristal violet dans la paroi des Gram +
Décoloration	Alcool-acétone (ou éthanol 95 %)	15—30 s	Éliminer la coloration des Gram —
Contre-coloration	Fuchsine basique (ou safranine)	30 s—1 min	Colorer les Gram — en rose/rouge
Observation	Rinçage à l'eau distillée + séchage	-	Préparer la lame pour l'observation microscopique

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عبد الحميد بن باديس - مستغانم -
كلية علوم الطبيعة والحياة

تصريح شرفي خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية
لإنجاز البحث

أنا الممضي أدناه،

الطالب(ة): بن يوسف إسراء رقم التسجيل الجامعي: 202037032535

الحامل لبطاقة التعريف الوطنية رقم: 1300841100385800 والصادرة بتاريخ: 2023/01/29

عن بلدية بن يوسف قيسر - مستغانم

المسجل بكلية علوم الطبيعة والحياة / قسم البيولوجيا

شعبة العلوم البيولوجية / التخصص الوراثة الأساسية والتطبيقية

والمكلف بإنجاز مذكرة ماستر بعنوان:

تحليل جين ARK1 في عزلة بكتيرية لبيئية تم عزلها من

القمح الخمير باستخدام أدوات المعلوماتية الجينية لتحليل التسلسل

أصرح بشرفي أنني ألتزم بمراعاة المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات العلمية والنزاهة الأكاديمية
المطلوبة في إنجاز البحث ، وأتحمل المسؤولية الشخصية عن كل المحتوى المتضمن في البحث المذكور أعلاه .

التاريخ: 2023/10/13

إمضاء المعني



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عبد الحميد بن باديس - مستغانم -
كلية علوم الطبيعة والحياة

تصريح شرفي خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية
لإنجاز البحث

أنا الممضي أدناه،

الطالب(ة): العجال إسمان رقم التسجيل الجامعي 202037032539

الحامل لبطاقة التعريف الوطنية رقم: 11002096303108 والصادرة بتاريخ: 2020-06-16

عن الديب بوقيرات مستغانم

المسجل بكلية علوم الطبيعة والحياة / قسم البيولوجيا

شعبة العلوم البيولوجية / التخصص الوراثة الأساسية وتطبيقاتها

والمكلف بإنجاز مذكرة ماستر بعنوان:

تحليل جين ARN_v 16S من عزلة بكتيرية لبنية تم عزلها من العنق المخصب باستخدام أدوات المعلوماتية الحيوية لتحليل التنوع

أصرح بشرفي أنني ألتزم بمراعاة المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات العلمية والنزاهة الأكاديمية المطلوبة في إنجاز البحث ، وأتحمل المسؤولية الشخصية عن كل المحتوى المتضمن في البحث المذكور أعلاه .

التاريخ: 2025/10/13

إمضاء المعني

