

---

## ETUDE DU POTENTIEL PROBIOTIQUE DES MICROORGANISMES DE DIVERSES MATRICES BIOLOGIQUES POUR DES APPLICATIONS EN ALIMENTATION ANIMALE.

**Auteur :** Yao, Ange Olivier Parfait

**Promoteur(s) :** Jacques, Philippe; Razafindralambo, Hary

**Faculté :** Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

**Diplôme :** Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

**Année académique :** 2022-2023

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/17866>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

**ETUDE DU POTENTIEL PROBIOTIQUE DES SOUCHES MICROBIENNES  
ISOLEES DE MATRICES BIOLOGIQUES POUR DES APPLICATIONS EN  
ALIMENTATION ANIMALE**

**YAO ANGE OLIVIER PARFAIT**

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU  
DIPLÔME DE MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

**ANNEE ACADÉMIQUE 2022-2023**

**CO-PROMOTEURS : PROF P. JACQUES & DR H. RAZAFINDRALAMBO**

©Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.



**ETUDE DU POTENTIEL PROBIOTIQUE DES SOUCHES MICROBIENNES  
ISOLEES DE MATRICES BIOLOGIQUES POUR DES APPLICATIONS EN  
ALIMENTATION ANIMALE**

**YAO ANGE OLIVIER PARFAIT**

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU  
DIPLÔME DE MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

**ANNEE ACADÉMIQUE 2022-2023**

**CO-PROMOTEURS: PROF P. JACQUES & DR H. RAZAFINDRALAMBO**

## **Remerciements**

Ce travail de recherche a été réalisé au Centre de recherche Terra, de la faculté de Gembloux AgroBioTech, au sein du laboratoire de Microbial Process and Interactions (MiPI) sous la direction du Professeur Philippe Jacques et du docteur Hary Razafindralambo.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Philippe Jacques d'avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire et d'encadrer mon travail. Merci cher Professeur pour votre disponibilité et vos conseils avisés.

Mes remerciements s'adressent au président du jury, le professeure Giorgia Purcaro d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Je remercie vivement le Docteur Hary Razafindralambo pour avoir accepté de co-encadrer mon travail. Merci à vous pour votre disponibilité et pour tous vos précieux conseils ainsi que l'amour pour la recherche que vous distillez.

Je remercie également le Professeur Patrick Fickers, le Professeur Drider Djamel, le docteur Paul Malumba et le docteur Alabi Taofic d'avoir accepté de participer à mon jury.

Je remercie tout particulièrement l'Université Péléforo Gon Coulibaly de Korhogo (Côte d'Ivoire) avec à sa tête le Professeur Coulibaly Adama et ses collaborateurs, spécialement le docteur Alabi et le Professeur Silué, chefs d'orchestre de la collaboration entre ces deux universités. Merci pour tous les efforts consentis afin que mon projet d'étude à l'Université de Liège puisse se réaliser.

Je remercie le Docteur Moroh Jean-Luc pour le soutien et les conseils avisés.

Je remercie aussi tous les chercheurs du laboratoire du MiPI pour leur précieux aide dans la réalisation de mon travail de fin d'étude.

Je remercie mon parrain, le Père Melaine pour son appui et ses prières à mon égard.

Je remercie également Marina et Marguerite, pour leur disponibilité, leur gentillesse et pour leur prise en charge efficace des tâches administratives.

Je remercie mes collègues : Elie, Kawtar et Caroline pour tous ces agréables moments que nous avons partagé.

Merci également à mes amis : Jean Paul, Fanta, Joseph, Rosaire, Alfred, Bintou, Madinatou, Koré et Mian, Konan, Armelie, Ben, Khadija, Rama, Melissa. Merci pour tous les moments passés ensemble dans cette aventure enrichissante ici en Belgique. Merci pour votre soutien indéfectible. Je vous souhaite le succès, car vous tenez le bon bout !

Je tiens à remercier en fin ma famille et tout particulièrement ma mère et mon oncle (Ahebee Parfait), pour m'avoir continuellement soutenu.

Merci à tous ceux qui de prêt ou de loin, n'ont cessé de me soutenir tant en prière que moralement. Que Dieu vous bénisse !

En espérant n'avoir oublié personne.

## Résumé

Les probiotiques sont des microorganismes d'origine variée, capables d'impacter positivement la flore intestinale. Le potentiel probiotique des souches microbiennes isolées de matrices biologiques en provenance du Maroc a été étudié sur base de quelques critères. Ceux-ci incluent, la résistance aux antibiotiques, la capacité à adhérer aux solvants, la capacité à produire des substances antimicrobiennes et la capacité à coloniser le tractus gastro-intestinal. L'emploi de techniques moléculaires (ADN 16S) et analytiques (MALDI-ToF-MS), ont permis d'identifier plusieurs microorganismes.

Les propriétés probiotiques de cinq d'entre eux (*Lactobacillus plantarum* issu du levain, *Leuconostoc pseudomesenteroides* et *Leuconostoc mesenteroides* isolés du fromage frais de chèvre, *Enterococcus durans* et *Lactobacillus casei* isolés du lait fermenté) ont été caractérisés notamment, leur croissance dans un bouillon MRS, leur viabilité aux pH de 2,5 et 6,5 en présence de sels biliaries (1%), leur hydrophobicité de surface, leur capacité d'autoagrégation, leur profil de décomposition thermogravimétrique et leur capacité à exprimer une activité antagoniste à l'égard de certains pathogènes. Les résultats des tests d'antagonisme ont montré que les souches de *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc mesenteroides* isolées inhibent la croissance des pathogènes *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Escherichia coli* alors que les souches de *Enterococcus durans* et *Lactobacillus casei* sont efficaces contre *B. cereus* et *E. coli*. Les résultats de l'antibiogramme se sont montrés satisfaisants en termes de sensibilité pour la majorité des souches sauf *Enterococcus durans* qui a présenté une résistance vis-à-vis de chacun des antibiotiques testés. Cette souche est cependant, la seule à croître à pH 2,5 en présence de 1% de sels biliaries, ce qui lui confère l'aptitude à survivre dans les conditions gastro-intestinales. La capacité des souches à produire des substances émulsifiantes, a été étudiée à travers la détermination de l'indice d'émulsion (exprimé en pourcentage) des surnageants de culture mélangés avec du toluène. Les résultats ont montré que le surnageant de culture de *Leuconostoc pseudomesenteroides* présente la meilleure capacité à former une émulsion (81,72%). Cependant, l'émulsion la plus stable a été obtenue avec le surnageant de *Leuconostoc mesenteroides* qui passe seulement de 8,7% à 0h à 8,6% après 24h. Globalement l'ensemble des bactéries utilisées ont une bonne capacité d'autoagrégation (plus de 90%). Les propriétés d'hydrophobicité de surface exprimées en pourcentage représentent l'aptitude des cellules bactériennes étudiées à se développer sur un substrat non miscible. Ces pourcentages varient d'une espèce à l'autre et est de 36,82%, 28,18%, 39,23% et 26,72% respectivement pour *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Enterococcus durans* et *Lactobacillus casei*. Ces deux derniers paramètres, sont les principales propriétés de surface évaluées dans cette étude. Toutes ces observations montrent clairement que les matrices analysées renferment bien évidemment de potentiels candidats probiotiques.

**Mots clés :** probiotique, bactéries lactiques, adhésion, antagonisme, MALDI-ToF MS, ADN 16S

## Abstract

Probiotics are microorganisms of varied origin, capable of positively impacting intestinal flora. The probiotic potential of microbial strains isolated from biological matrices from Morocco was studied based on several criteria. This included antibiotic resistance, ability to adhere to solvents, ability to produce antimicrobial substances and ability to colonize the gastrointestinal tract. Molecular (16S DNA) and analytical (MALDI-ToF-MS) techniques have been used to identify several microorganisms. The probiotic properties of five of them (*Lactobacillus plantarum* from sourdough, *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from fresh goat's cheese, *Enterococcus durans* and *Lactobacillus casei* isolated from fermented milk) were characterized including their growth in MRS broth, their viability at pH 2.5 and 6.5 in the presence of bile salts (1%), their surface hydrophobicity, their ability to autoaggregate, their thermogravimetric decomposition pattern and their ability to express antagonistic activity towards certain pathogens. The results of antagonism tests showed that isolated *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* strains inhibited the growth of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* pathogens, while *Enterococcus durans* and *Lactobacillus casei* strains were effective against *B. cereus* and *E. coli*. Antibiotic susceptibility results were satisfactory for most strains, except for *Enterococcus durans*, which showed resistance to each of the antibiotics tested. This strain was, however, the only one to grow at pH 2.5 in the presence of 1% bile salts, giving it the ability to survive in gastrointestinal conditions. The ability of strains to produce emulsifying substances was studied by determining the emulsion index (expressed as a percentage) of culture supernatants mixed within toluene. The results showed that *Leuconostoc pseudomesenteroides* culture supernatants had the highest emulsion-forming capacity (81.72%). However, the supernatant of *Leuconostoc mesenteroides* showed the best emulsifying stability which only went from 8.7% at 0h to 8.6% after 24h. Overall, all the bacteria used have a good autoaggregation capacity (over 90%). The surface hydrophobicity properties expressed as a percentage represent the ability of the bacterial cells studied to grow on an immiscible substrate. These percentages vary from species to species and are 36.82%, 28.18%, 39.23% and 26.72% respectively for *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Enterococcus durans* and *Lactobacillus casei*. These last two parameters were the main surface properties evaluated in this study. All these observations clearly show that the matrices analyzed obviously contain potential probiotic candidates.

**Keywords:** probiotic, lactic acid bacteria, adhesion, antagonism, MALDI-ToF MS, 16S DNA

## Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique  
ANOVA: Analysis of variance  
ATB: Antibiotique  
CHCA: Cyano-4-hydroxycinnamique  
CLR: Chloramphenicol  
COV: Composés Organiques Volatiles  
DHB: Dihydroxybenzoïque  
DO: Densité optique  
ERY: Erythromycin  
FAO: Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture  
GRAS: Generally recognized as Safe  
HPLC: High performance liquid chromatography  
KAN: Kanamycin  
MALDI-ToF MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation  
MH: Muller Hilton  
MRS: deMan, Rogosa et Sharpe  
NaCl: Chlorure de sodium  
PBS: Phosphate buffer saline  
PEN: Penicillin  
PMF: Peptide Mass Fingerprint  
QPS: Qualifié Présomption Sécurité  
RCM: Reinforced Clostridium Medium  
STR: Streptomycin  
TET: Tetracycline  
TOF: Time of Fly  
UFC/ml= Unité formant colonie par millilitre

## Table des matières

### Introduction

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Synthèse bibliographique.....</b>                         | <b>3</b>  |
| 1.1      | Historique et définition des probiotiques .....              | 3         |
| 1.2      | Classification des probiotiques .....                        | 3         |
| 1.2.1    | Les bactéries lactiques.....                                 | 5         |
| 1.2.2    | Les bifidobactéries.....                                     | 6         |
| 1.2.3    | Le genre <i>Bacillus</i> .....                               | 7         |
| 1.2.4    | Les levures .....  | 9         |
| 1.3      | Règlementations.....   | 9         |
| 1.4      | Applications des probiotiques.....                           | 10        |
| 1.4.1    | Les probiotiques en santé humaine .....                      | 11        |
| 1.4.2    | Probiotiques en agronomie .....                              | 12        |
| 1.4.2.1  | Probiotique en élevage .....                                 | 12        |
| 1.4.2.2  | Probiotiques pour les plantes .....                          | 12        |
| 1.5      | Mécanisme d'action des probiotiques.....                     | 13        |
| 1.5.1    | Effet barrière.....  | 13        |
| 1.5.2    | Effet d'immunomodulation.....                                | 14        |
| 1.5.3    | Interaction plante-microorganisme .....                      | 14        |
| 1.5.4    | Activité antimicrobienne .....                               | 15        |
| 1.5.5    | Colonisation et compétition .....                            | 16        |
| 1.6      | Critères de sélection des probiotiques.....                  | 16        |
| 1.7      | Identification des probiotiques .....                        | 17        |
| 1.7.1    | Identification par spectrométrie de masse MALDI-ToF MS ..... | 18        |
| 1.7.1.1  | Principe de base.....  | 18        |
| 1.7.1.2  | Application à l'identification des probiotiques.....         | 19        |
| <b>2</b> | <b>Matériel et Méthodes.....</b>                             | <b>22</b> |
| 2.1      | Matériel.....  | 22        |
| 2.1.1    | Échantillonnage.....   | 22        |
| 2.1.2    | Souches et milieux de cultures.....                          | 22        |
| 2.1.3    | Autres réactifs .....  | 23        |
| 2.2      | Méthodes.....  | 23        |
| 2.2.1    | Préparation de milieu de culture.....                        | 23        |
| 2.2.2    | Culture et isolement des probiotiques.....                   | 23        |
| 2.2.3    | Cinétique de croissance .....                                | 24        |
| 2.2.4    | Dénombrement bactérien.....                                  | 24        |
| 2.2.5    | Observation macroscopique .....                              | 24        |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 2.2.6     | Observation microscopique .....  | 24 |
| 2.2.7     | Conservation des souches d'intérêt.....  | 24 |
| 2.2.8     | Identification .....   | 25 |
| 2.2.8.1   | Identification protéomique par MALDI-ToF MS.....   | 25 |
| 2.2.8.1.1 | Préparation des isolats pour l'analyse protéomique .....                                     | 25 |
| 2.2.8.1.2 | Analyse des spectres obtenus .....   | 25 |
| 2.2.8.2   | Identification par séquençage d'ADN 16S.....   | 26 |
| 2.2.9     | Caractérisation des souches probiotiques .....   | 26 |
| 2.2.9.1   | Dosage des métabolites produits .....  | 26 |
| 2.2.9.2   | Indice d'émulsion .....  | 27 |
| 2.2.9.3   | Mise en évidence <i>in vitro</i> de quelques propriétés physiologiques des probiotiques..... | 27 |
| 2.2.9.3.1 | Résistance au stress thermique.....  | 27 |
| 2.2.9.3.2 | Résistance à l'acide et aux sels biliaires.....  | 27 |
| 2.2.9.3.3 | Activité antimicrobienne .....   | 27 |
| 2.2.9.3.4 | Test de sensibilité aux antibiotiques.....   | 28 |
| 2.2.9.3.5 | Autoagrégation.....  | 28 |
| 2.2.9.3.6 | Adhésion au solvant .....  | 29 |
| 2.2.10    | Analyses statistiques .....  | 29 |
|           | Résultats et discussions.....  | 30 |
| 3         | Résultats et Discussions.....  | 31 |
| 3.1       | Résultats.....   | 31 |
| 3.1.1     | Observations macroscopiques .....  | 31 |
| 3.1.2     | Observation microscopique .....  | 31 |
| 3.1.3     | Identification par séquençage ADN 16S .....  | 32 |
| 3.1.4     | Identification par spectrométrie de Masse Maldi-ToF .....                                    | 32 |
| 3.1.5     | Courbe de croissance.....  | 33 |
| 3.1.6     | Mesure du pH.....  | 34 |
| 3.1.7     | Dosage des métabolites par HPLC.....   | 34 |
| 3.1.8     | Étude du potentiel probiotique des souches d'intérêt .....                                   | 35 |
| 3.1.8.1   | Tolérance à l'acidité et aux sels biliaires.....   | 35 |
| 3.1.8.2   | Adhésion aux solvant et autoagrégation .....   | 36 |
| 3.1.8.3   | Indice d'émulsion .....  | 37 |
| 3.1.9     | Propriété de biosécurité : sensibilité aux antibiotiques.....                                | 38 |
| 3.1.9.1   | Antibiogramme.....   | 38 |
| 3.1.9.2   | Test d'antagonisme .....   | 39 |
| 3.2       | Discussion .....   | 40 |

## Conclusion et perspectives

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>4</b>   | <b>Annexes.....</b>                     | <b>46</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Milieu de culture .....</b>          | <b>46</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Solution tampon.....</b>             | <b>47</b> |
| <b>5</b>   | <b>Références bibliographiques.....</b> | <b>52</b> |

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : Arbre phylogénétique consensus, basé sur la comparaison de séquence d'ARNr 16S, montrant les principaux groupes de bactéries lactiques, ayant un faible contenu mol% de G+C de l'ADN ainsi que les bactéries Gram positives non reliées des genres <i>Bifidobacterium</i> et <i>Propionibacterium</i> <sup>15</sup> .....  | 6  |
| Figure 2 : Cycle de vie de <i>Bacillus subtilis</i> dans l'environnement <sup>52</sup> .....  | 8  |
| Figure 3 : Les principaux effets bénéfiques des probiotiques en santé humaine et animale <sup>61</sup> .....  | 11 |
| Figure 4 : Représentation schématique des mécanismes d'action des probiotiques <sup>52</sup> .....  | 13 |
| Figure 5 : Microscopie confocale à balayage laser de racines de betteraves sucrières de 3 semaines colonisées par des bactéries marquées DsRed2 : <i>A. P. fluorescens</i> L13-6-12 et <i>B. P. trivialis</i> RE*1-1-14. C reconstitution tridimensionnelle d'une coupe transversale d'une zone densément colonisée par <i>P. trivialis</i> RE*1-1-14 avec Imaris® 6.0 (Bitplane AG, Zürich).....   | 15 |
| Figure 6 : Diagramme de l'interaction positive de base entre le métabolisme de la plante et ses colonisateurs racinaires de type probiotique <sup>1</sup> .....   | 15 |
| Figure 7 : Spectromètre de masse Brucker Autoflex speed et son système informatique <sup>6</sup> .....  | 19 |
| Figure 8 : Processus schématique pour l'analyse au MALDI-TOF/MS.....  | 20 |
| Figure 9 : Plaque métallique dédiée à l'analyse au spectromètre de masse Maldi-TOF comportant les cellules bactériennes recouvertes de matrice prêtes à être identifiées.....   | 25 |
| Figure 10 : Aspect macroscopique des souches isolées des matrices étudiées. A : levain (MALEM17_1-1), B : vinaigre de cidre (MAPOM17_1), C : fromage de vache (MAVAMRS2), D : fromage frais de chèvre (MACHMRS_1-1), E : lait fermenté (MALAM17_1-2) et F : olive (MAOLMRS_1-1).....  | 31 |
| Figure 11 : Aspect microscopique des souches isolées des échantillons de levain, du fromage de chèvre et du lait fermenté provenant du Maroc.....   | 32 |
| Figure 12 : Courbe de croissance bactérienne de cinq des souches isolées en bouillon MRS à un pH initial de 6,8 ; avec une température de 37°C, en anaérobie, sous agitation en mode double orbitale (amplitude : 1 mm ; fréquence : 270 tr/min), avec une durée 24h de culture (A). Dénombrement réalisé sur de la gélose MRS dans les mêmes conditions de température et de pH après une pré-culture de 18h dans du MRS liquide (B)......                                       | 33 |
| Figure 13: Taux de croissance microbienne par heure en considérant le logarithme des données de la densité optique dans la phase exponentielle pour deux différentes conditions de culture : milieu MRS liquide à pH 6,8 et 0% de sels biliaires (SB) ; milieu MRS liquide à pH 6,5 et 1% de sels biliaires. ....   | 33 |
| Figure 14 : Mesure de l'évolution du pH au cours d'une culture de 72h à 37°C dans un bouillon MRS à l'aide d'un pH-mètre électronique (doté d'une électrode sentix 41 stockée dans 3mol/l de KCl). ....   | 34 |
| Figure 15 : Détermination par HPLC de la concentration en acides organiques des surnageants de cultures de 24h à 37°C centrifugées à 5000g pendant 10min puis filtrées à l'aide d'une seringue de 0,22mm. modèle de l'appareil : AGILENT 1200, Californie, USA; la phase mobile: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5mM, flow: 0,5mL/min, colonne: Aminex HPX-87H, température de la colonne: 50°C, température de la colonne RID: 45°C, volume d'injection: 15µL, temps: 35min)..... | 35 |
| Figure 16 : Évolution de la densité optique à 600nm en fonction du temps de cinq souches dans deux différentes conditions de croissance bouillon MRS ; anaérobie 37°C ; (A) : pH6,5 BS1% et (B) :   |    |

|   |    |
|---|----|
| pH2,5 BS1%. Les courbes sont obtenues sur la base des valeurs moyennes à DO <sub>600nm</sub> en trois répétitions dans chaque condition de culture.....   | 36 |
| Figure 19 : Mesure de l'autoagrégation à partir des surnageants de culture en fonction du temps (A) et de l'hydrophobicité des cellule lavées au PBS (pH 7) mise en contact avec un solvant hydrophobe (Toluène 99% de pureté) (B)..... | 36 |
| Figure 20 : Aspect microscopique de la formation d'agrégats des cellules bactériennes lavées et laissées séjournées 5h dans du tampon PBS.....  | 37 |
| Figure 21 : Aspect macroscopique du test d'émulsion entre à t=0h (A) et à t=24h (B) des surnageants de culture de cinq (5) souches d'intérêt isolées mise en contact avec un composé hydrophobe (toluène).....                          | 37 |
| Figure 22 : Indice d'émulsion des surnageants de cultures de cinq souches avec du toluène (v/v). Cet indice est obtenu par la mesure de hauteur d'émulsion formée à 0h et après 24h.....  | 38 |
| Figure 23 : Zones d'inhibition de six antibiotiques testés contre les souches isolées.....  | 39 |
| Figure 24 : Activité antimicrobienne des cinq (5) souches identifiées vis-à-vis des souches indicatrices Bacillus cereus (A), Staphylococcus epidermidis (B) et E. coli (C) inoculées à la surface d'une gélose MRS.....                | 39 |

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1: Liste des unités taxonomiques proposées par l'EFSA pour le statut de présomption de sécurité mais également comme GRAS <sup>14</sup> .....  | 3  |
| Tableau 2: Liste des microorganismes considérés comme des probiotiques <sup>15</sup> .....   | 4  |
| Tableau 3 : Liste non exhaustive des principaux produits commerciaux contenant un ou plusieurs souches de Bacillus probiotique <sup>52</sup> .....   | 9  |
| Tableau 4 : Principaux critères non exhaustifs de sélection des souches probiotiques selon la FAO <sup>100</sup> .....   | 16 |
| Tableau 5 : Méthodes d'identification microbienne utilisées en microbiologie <sup>105</sup> .....  | 18 |
| Tableau 6 : Liste des échantillons bruts issus du Maroc.....   | 22 |
| Tableau 7 : Liste non exhaustive du matériel technique utilisé tout au long de ces travaux.....  | 22 |
| Tableau 8 : Liste des bactéries pathogènes utilisées pour réaliser l'ensemble des tests d'antagonisme  | 23 |
| Tableau 9 : Score d'identification des souches bactériennes d'intérêts en comparaison avec les références de la base de données à travers l'identification par spectrométrie de masse MALDI-ToF. | 26 |
| Tableau 10 : Les différents antibiotiques utilisés pour réaliser un antibiogramme.....   | 28 |
| Tableau 11 : Liste des souches identifiées par MALDI-ToF et ADN 16S à partir d'échantillons bruts. ....  | 32 |
| Tableau 12 : Tableau d'analyse de la variance de l'autoagrégation (A) de souches et de leur hydrophobicité (B).....  | 37 |
| Tableau 13 : Antibiogramme réalisé avec six (6) antibiotiques différents contre les cinq (5) potentiels probiotiques.....  | 38 |
| Tableau 14 : Mesure des diamètres d'inhibition des isolats exprimés en mm matérialisé par les signes : +(inhibition) et – pour (pas d'inhibition).....   | 39 |

## Introduction

Le monde moderne est confronté à de nombreux défis liés à la sécurité des aliments et à la santé<sup>1,2</sup>. D'une part, satisfaire les besoins en alimentation saine et de qualité est devenu une préoccupation mondiale<sup>3</sup> qui a conduit à une prise de conscience générale dans notre société, en raison, par exemple, de la présence de résidus de produits chimiques nocifs (pesticides) utilisés lors du traitement de certaines affections en agronomie. D'autres part, l'utilisation abusive et inappropriée d'antibiotiques en tant que facteur de croissance ou de prévention de maladies chez les animaux d'élevage<sup>4</sup> est à l'origine de l'antibiorésistance chez certains microorganismes pathogènes (*E. coli*, *S. enteritidis*, and *S. aureus*), ce qui rend les antibiotiques moins efficaces et constitue une réelle menace pour notre santé et celle des animaux<sup>5,6</sup>.

À l'heure actuelle, plusieurs recherches sont effectuées pour trouver des alternatives plus naturelles et durables aux problèmes liés aux résidus chimiques et à l'antibiorésistance pour notre alimentation et notre santé<sup>5,7</sup>. Parmi les alternatives potentielles figurent l'utilisation de probiotiques, des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité adéquate, ont des effets bénéfiques et régulateurs du microbiote agissant sur la santé de l'hôte<sup>8</sup>. Les probiotiques s'avèrent bénéfiques, non seulement pour la santé humaine, mais aussi pour les animaux, des plantes et de l'environnement<sup>1</sup>. En effet, les probiotiques peuvent pallier les nombreuses perturbations gastro-intestinales dues au déséquilibre du microbiote intestinal, notamment les diarrhées associées aux prises d'antibiotiques, les ulcères, les maladies inflammatoires de l'intestin, le syndrome du côlon irritable et d'autres causes plus graves comme le cancer du côlon<sup>9</sup>. L'origine de ces microorganismes bénéfiques était autrefois, l'homme sain, le lait et les produits laitiers<sup>10</sup>. Cette idée a beaucoup évolué avec la découverte de nouvelles souches de probiotiques dans divers produits fermentés alimentaires ou non alimentaires issus de plusieurs régions du monde<sup>11,12</sup> dont le criblage et la sélection sont soumis à des critères de bases définis par l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'organisation mondiale de la santé (OMS). Il s'agit entre autres de la tolérance au transit orogastro-intestinal, la production de substances antimicrobiennes, la sensibilité aux antibiotiques, l'adhérence à la muqueuse intestinale humaine et l'activité immunomodulatrice souhaitée<sup>13</sup>. Par ailleurs, la capacité des probiotiques à réduire les effets négatifs dû au stress thermique chez certains animaux et les effets des métaux lourds, en particulier la contamination environnementale par le plomb dans les systèmes d'élevages, sont de nouvelles approches dans ce domaine<sup>14,15</sup>.

Comparativement aux aliments fermentés, une des sources de probiotiques, des pays développés en Europe, en Asie et aux Etats-Unis, relativement très peu d'études ont été menées sur ceux des pays en voie de développement, et encore moins sur leurs propriétés et leurs effets bénéfiques sur la santé et la nutrition. C'est dans cet ordre d'idée que s'inscrit ce travail de fin d'étude de master Bioingénieur qui consiste à isoler et à identifier des souches de probiotiques de matrices biologiques originaires d'Afrique pour des application animale. Cela passe par l'atteinte de trois objectifs spécifiques, à savoir : (1) la sélection de produits sources, l'isolement de souches sur des milieux spécifiques aux probiotiques et le stockage des isolats à -80°C pour des utilisations ultérieures ;

(2) L'identification des souches à partir des isolats. A ce jour, des outils d'identification précis de microorganismes existent<sup>16</sup>. A côté des méthodes d'identification basées sur le séquençage d'ADN employées depuis des décennies<sup>17,18</sup> figurent de nouvelles techniques par approche protéomique automatisées impliquant la spectrométrie de masse<sup>19,20</sup>. Ces deux méthodes d'identification microbienne seront employées pour s'assurer de la fiabilité des résultats.

(3) la caractérisation des souches potentielles. Cette étape consiste à réaliser un éventail de tests qui mettent en évidence les performances probiotiques des souches identifiées.

# 1 Synthèse bibliographique

## 1.1 Historique et définition des probiotiques

Le concept des probiotiques est introduit pour la première fois par le Prix Nobel Russe, Elie Metchnikoff qui avait estimé que la longévité de vie des personnes vivant dans la partie nord de l'Europe fût liée à leur consommation de laits fermentés<sup>2,3</sup>. Alors que les bienfaits des bactéries étaient encore méconnus à son époque, Metchnikoff proposa le remplacement des germes pathogènes du tractus gastro-intestinal par des bactéries issues des produits laitiers fermentés, dont le yaourt contenant les bacilles bulgares qui ont un effet positif sur la santé de l'hôte. Il postula que les bactéries du yaourt ainsi que leurs métabolites présentaient des biens meilleurs propriétés que celles du kéfir ou le koumys<sup>4</sup>, d'où la nécessité de sélectionner les souches performantes des probiotiques, qui se faisait jadis principalement au travers de la sélection de leurs matières d'origine<sup>5</sup>. C'est finalement en 2002 que la FAO (Food and Agriculture Organization) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) ont défini officiellement le terme « probiotiques » : « microorganismes vivant apportant des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte lorsqu'ils sont administrés en quantité raisonnable<sup>6,7</sup> ». Certains probiotiques sont ainsi utilisés pour leur rôle prophylactique et thérapeutique aussi bien chez les êtres humains que chez les animaux<sup>8</sup>. Ces effets sont également validés par de nombreuses études cliniques lorsque les probiotiques sont ingérés en proportion raisonnable<sup>9</sup>. Néanmoins il fut démontré que les probiotiques ne peuvent à eux seuls remplacer totalement les antibiotiques dans le cas d'une infection<sup>10</sup>. Les définitions concernant l'impact sur le microbiote intestinal ou l'amélioration des fonctions immunitaires a été supprimé afin de prendre en compte les effets sur la santé et de permettre l'application du terme "probiotique" avant que le mécanisme ne soit confirmé<sup>11</sup>.

## 1.2 Classification des probiotiques

A quelques exceptions près (levures), la majorité des microorganismes considérés comme GRAS sont des bactéries et les espèces les plus abordées dans la littérature en tant que probiotiques appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* suivie des genres *Enterococcus* et *Streptococcus*. Aux bactéries de ces genres s'ajoutent certaines bactéries du genre *Bacillus* ainsi que certaines levures (Tableau 1)<sup>12,13</sup>. Cependant, seulement une partie de ces microorganismes peuvent être considérés comme probiotiques (Tableau 2).

Tableau 1: Liste des unités taxonomiques proposées par l'EFSA pour le statut de présomption de sécurité mais également comme GRAS<sup>14</sup>

| Espèces                             |                                 |                                |
|-------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | <i>Bifidobacterium bifidum</i>  | <i>Bifidobacterium longum</i>  |
| <i>Bifidobacterium animalis</i>     | <i>Bifidobacterium breve</i>    |                                |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i>   |                                 |                                |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i>    | <i>Lactobacillus farciminis</i> | <i>Lactobacillus paracasei</i> |

|                                   |                                      |                                    |
|-----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Lactobacillus amyolyticus</i>  | <i>Lactobacillus fermentum</i>       | <i>Lactobacillus paraplantarum</i> |
| <i>Lactobacillus amylovorus</i>   | <i>Lactobacillus gallinarum</i>      | <i>Lactobacillus pentosus</i>      |
| <i>Lactobacillus alimentarius</i> | <i>Lactobacillus gasseri</i>         | <i>Lactobacillus plantarum</i>     |
| <i>Lactobacillus aviaries</i>     | <i>Lactobacillus helveticus</i>      | <i>Lactobacillus pontis</i>        |
| <i>Lactobacillus brevis</i>       | <i>Lactobacillus hilgardi</i>        | <i>Lactobacillus reuteri</i>       |
| <i>Lactobacillus buchneri</i>     | <i>Lactobacillus johnsonii</i>       | <i>Lactobacillus rhamnosus</i>     |
| <i>Lactobacillus casei</i>        | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> | <i>Lactobacillus sakei</i>         |
| <i>Lactobacillus crispatus</i>    | <i>Lactobacillus kefirii</i>         | <i>Lactobacillus salivarius</i>    |
| <i>Lactobacillus curvatus</i>     | <i>Lactobacillus mucosae</i>         | <i>Lactobacillus</i>               |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i>  | <i>Lactobacillus panis</i>           | <i>sanfranciscensis</i>            |
|                                   |                                      | <i>Lactobacillus zeae</i>          |
| <i>Lactococcus lactis</i>         |                                      |                                    |
| <i>Leuconostoc citreum</i>        | <i>Leuconostoc lactis</i>            |                                    |
| <i>Pediococcus acidilactici</i>   | <i>Pediococcus dextrinicus</i>       | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>   |
|                                   |                                      | <i>Pediococcus pentosaceus</i>     |
| <i>Propionibacterium</i>          |                                      |                                    |
| <i>freudenreichii</i>             |                                      |                                    |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> |                                      |                                    |
| <b>Bacillus</b>                   |                                      |                                    |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | <i>Bacillus lentus</i>               |                                    |
| <i>Bacillus atrophaeus</i>        | <i>Bacillus licheniformis</i>        | <i>Bacillus pumilus</i>            |
| <i>Bacillus clausii</i>           | <i>Bacillus megaterium</i>           | <i>Bacillus subtilis</i>           |
| <i>Bacillus coagulans</i>         | <i>Bacillus mojavensis</i>           | <i>Bacillus vallismortis</i>       |
| <i>Bacillus fusiformis</i>        |                                      | <i>Geobacillus</i>                 |
|                                   |                                      | <i>stearothermophilus</i>          |
| <b>Levures</b>                    |                                      |                                    |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>      |                                      |                                    |
| <i>Hansenispa uvarum</i>          |                                      |                                    |
| <i>Kluyveromyces lactis</i>       | <i>Kluyveromyces marxianus</i>       |                                    |
| <i>Pichia angusta,</i>            | <i>Pichia anomala</i>                |                                    |
| <i>Saccharomyces bayanus</i>      | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>      |                                    |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i>  |                                      | <i>Saccharomyces pastorianus</i>   |
| <i>Xanthophyllomyces</i>          |                                      | (synonym of                        |
| <i>dendrorhous</i>                |                                      | <i>Saccharomyces</i>               |
|                                   |                                      | <i>carlsbergensis</i> )            |

Tableau 2: Liste des microorganismes considérés comme des probiotiques <sup>15</sup>

| <i>Lactobacillus</i>  | <i>Bifidobacteriu</i><br><i>m</i> | Autresbactéries<br>lactiques | Non productrices d'acide<br>lactique |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| <i>L. acidophilus</i> | <i>B. adolescentis</i>            | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Bacillus cereus</i> var. toyoi    |
| <i>L. amylovorus</i>  | <i>B. animalis</i>                | <i>Enterococcus faecium</i>  | <i>Escherichia coli</i> nissle       |

|                          |                    |                                    |   |
|--------------------------|--------------------|------------------------------------|---|
| <i>L. casei</i>          | <i>B. bifidum</i>  | <i>Lactococcus lactis</i>          | <i>Propionibacterium freudenreichii</i> |
| <i>L. crispatus</i>      | <i>B. breve</i>    | <i>Leuconstoc mesenteroides</i>    | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>         |
| <i>L. delbrueckii</i>    | <i>B. infantis</i> | <i>Pediococcus acidilactici</i>    | <i>Saccharomyces boulardii</i>          |
| subsp. <i>bulgaricus</i> | <i>B. lactis</i>   | <i>Sporolactobacillus inulinus</i> |   |
| <i>L. gallinarum</i>     | <i>B. longum</i>   | <i>Streptococcus thermophilus</i>  |   |
| <i>L. gasseri</i>        |                    |                                    |   |
| <i>L. johnsonii</i>      |                    |                                    |   |
| <i>L. paracasei</i>      |                    |                                    |   |
| <i>L. plantarum</i>      |                    |                                    |   |
| <i>L. reuteri</i>        |                    |                                    |   |
| <i>L. rhamnosus</i>      |                    |                                    |   |

---

### 1.2.1 Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et sont omniprésentes dans différentes niches écologiques incluant le lait, les produits laitiers, les végétaux, la viande, les muqueuses humaines et animales et même dans le sol, les engrais, et les eaux d'égout <sup>11</sup>. Leur rôle dans la préparation, la conservation et la transformation de nombreux aliments fermentés, permet de les identifier sous le terme de QPS « Présomption de Sécurité Qualifiée » <sup>16,12</sup>. Ces bactéries produisent de nombreuses substances antimicrobiennes comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et des bactériocines qui exercent une activité antagoniste vis-à-vis des microorganismes pathogènes et d'altérations <sup>17,18</sup>. Les bactériocines ont suscité beaucoup d'intérêt dans la durée de conservation des aliments <sup>19</sup> ainsi que dans le contrôle des maladies infectieuses <sup>12,20</sup>. La taxonomie des bactéries lactiques a beaucoup évolué depuis la description de l'espèce *Bacterium lactis* (actuellement *Lactococcus lactis*). De nombreux réajustements ont été faits ces dernières décennies pour permettre de mieux identifier les souches présentant des propriétés probiotiques et mettre en évidence celles qui se distinguent par des caractéristiques intéressantes <sup>21</sup>. La taxonomie décrite ici est basée sur un modèle prenant en compte les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques <sup>22,23</sup>.

Sur la base de leur morphologie, les bactéries lactiques sont regroupées en deux catégories : Les bacilles (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*) et les coques (*Lactococcus*, *Streptococcus*).

Les caractéristiques biochimiques et physiologiques permettant de classer les bactéries lactiques consistent à la production de gaz à partir du glucose, la croissance à différentes températures, la tolérance au NaCl, aux acides, à la bile, l'hydrolyse de l'arginine, à la détermination du profil d'hydrolyse des sucres et à la configuration de l'acide lactique <sup>24</sup>.

Ces méthodes se sont ensuite étendues jusqu'à l'étude de la composition de la paroi cellulaire bactérienne incluant la nature des acides gras (volatiles ou non), tels que l'acide lactobacillique et les acides gras insaturés qui la composent <sup>10,25</sup>. Le développement des techniques de biologie moléculaire ont permis d'intégrer de nouvelles méthodes d'identification d'espèces

bactériennes basées sur le séquençage de l'ARN 16S de gènes codant des protéines, de protéines ribosomales ou du génome entier <sup>26</sup>. Généralement les bactéries lactiques sont des micro-organismes à Gram positif, non sporulés, catalase négative à quelques exceptions près, qui se présentent sous forme de bâtonnets ou de coccobacilles. Ils sont fermentaires, micro aérophiles et chimio-organotrophes <sup>27</sup>. Ils appartiennent au phylum des Firmicutes, à la classe des Bacilli et à l'ordre des Lactobacillales. L'ordre de Lactobacille regroupe six familles (*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuococcaceae* et *Streptococcaceae*) formées de plusieurs genres dont 15 forment le groupe lactique : *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Alloicoccus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella* et *Tetragenococcus* (Figure 1). Parmi ces bactéries lactiques, les neuf premiers genres sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire<sup>28</sup>. Les relations phylogénétiques de ces principales bactéries lactiques, basées sur la comparaison des séquences d'ARNr 16S, montrent que *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Lactosphaera* sont parentés. *Lactococcus* et *Streptococcus* apparaissent comme relativement apparentés, alors que *Lactobacillus* est phylogénétiquement distinct (**Figure 1**). De nouveaux genres, par exemple *Isobaclum*, *Ermococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helococcus*, *Ignavigranum*, *Apoqobacter*, *Abiotrophia*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Trichococcus* *Marin* *ilactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Oscillospira*, ont également été décrits, et montrent des liens physiologiques et phylogénétiques avec le groupe des bactéries lactiques <sup>29,30</sup>. Récemment, deux nouvelles espèces de *Lactobacillus nasuensis* sp. nov et *Lactococcus fujiensis* sp. nov ont été isolées respectivement d'ensilage de sorgho et de feuilles de choux chinois <sup>31,32</sup>.

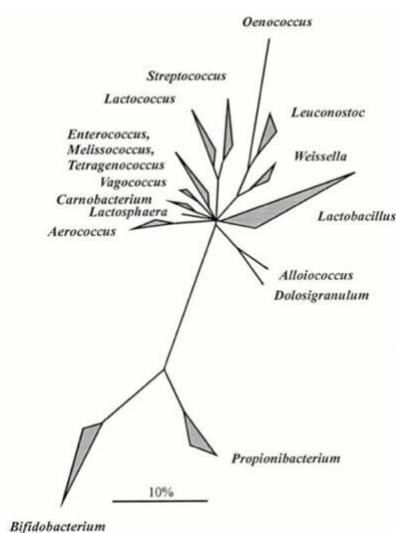


Figure 1 : Arbre phylogénétique consensus, basé sur la comparaison de séquence d'ARNr 16S, montrant les principaux groupes de bactéries lactiques, ayant un faible contenu mol% de G+C de l'ADN ainsi que les bactéries Gram positives non reliées des genres *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* <sup>15</sup>

### 1.2.2 Les bifidobactéries

Les bifidobactéries ont été isolées et visualisées pour la première fois à partir de fèces de nouveau-nés. Ces organismes en forme de bâtonnets, non producteurs de gaz et anaérobies ont

été nommés *B. bifidus* en raison de leur morphologie bifurquée. Ils sont généralement anaérobies Gram positifs, non sporulés, immobiles et catalase négatifs, avec une voie métabolique spéciale qui leur permet de produire de l'acide acétique en plus de l'acide lactique dans un rapport molaire de 3:2. En raison de leur nature fastidieuse, ces bactéries sont souvent difficiles à isoler et à cultiver en laboratoire. La taxonomie des bifidobactéries n'a cessé de changer depuis leur premier isolement. Elles avaient été initialement assignées aux genres *Bacillus*, *Bacteroides*, *Nocardia*, *Lactobacillus* et *Corynebacterium*, avant d'être reconnues comme des genres appartenant à la division des actinomycètes à l'aide de leur teneur en G+C supérieure à 50% molaire<sup>33</sup>. Les bifidobactéries sont des souches importantes dans le maintien de l'équilibre intestinal de l'hôte. Un nombre élevé de bifidobactéries dans le tube digestif réduirait le risque d'infection par des germes pathogènes. Elles sont fréquemment utilisées dans les préparations alimentaires et pharmaceutiques et leur application dans l'alimentation animale est en augmentation<sup>34,35</sup>.

### 1.2.3 Le genre *Bacillus*

La génétique et la physiologie du genre *Bacillus* sont telles que ce genre bactérien offre d'énormes possibilités en tant que probiotiques utilisables aussi bien chez les humains que chez les animaux<sup>36,37</sup>. Plusieurs études ont révélé la présence de spores de *Bacillus* dans le tractus intestinal des animaux, ce qui signifie qu'elles sont capables de survivre dans un tel environnement<sup>38-40</sup>. Les caractéristiques essentielles des *Bacillus spp.* comprennent leur capacité à survivre et à croître dans l'intestin, à former des biofilms et à sécréter des substances antimicrobiennes<sup>41,42</sup>. Ces bactéries peuvent être incorporées dans les aliments au cours du processus de granulation<sup>43</sup>. Chez des porcs nourris avec des *Bacillus spp.* les spores représentaient 72 % du total des comptes après 4 à 6 heures dans l'estomac et la section proximale de l'intestin grêle<sup>32</sup>. Au-delà de cette période, ce pourcentage décroît drastiquement par rapport à la valeur initiale<sup>44</sup>. Dans l'Union Européenne, l'utilisation de *Bacillus spp.* dans l'alimentation animale est réglementée par l'Autorité européenne de sécurité des aliments<sup>45</sup>. Les espèces *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus licheniformis* ont reçu un statut « présumé sûr », mais leur innocuité reste toujours à prouver<sup>46,47</sup>. Plusieurs études concernant les souches de *Bacillus* se sont intéressées à la biosynthèse d'enzyme comme les xylanases, les cellulases les amylases ou encore les protéases, largement utilisées dans l'industrie et la vie quotidienne. Grâce à leur capacité de survie dans des conditions hostiles (pH extrême de l'estomac par exemple) en se présentant sous forme sporulée contrairement aux Lactobacilles et à leur capacité de produire des composés antimicrobiens, ces bactéries gram positif sont de potentiels candidats probiotiques<sup>48</sup>. Ils ont un effet immunomodulateur sur les tissus lymphoïdes via l'absorption des cellules M des plaques de Preyer<sup>49</sup>.

L'origine du genre *Bacillus* est bien connue en raison de son accumulation dans l'environnement des produits comme les légumes avec lesquels ils vivent symbiose. Il n'est présent dans l'intestin humain ou animal qu'à travers l'alimentation. En revanche, des études ont montré que les spores de *Bacillus* probiotique pouvaient se développer dans l'intestin afin d'y exercer des effets bénéfiques<sup>48,50</sup>. Cela s'observe chez les animaux dont le tractus gastro-intestinal est très souvent colonisé par des souches de *Bacillus* (**Figure 2**).

Arrivées dans l'estomac, les cellules végétatives périssent tandis que les spores survivent malgré les conditions extrêmes de pH. Dans l'intestin, riche en nutriments, les spores vont pouvoir se mettre sous forme végétative rapidement, compte tenu de la disponibilité de nutriments. Elles vont ensuite se disséminer dans les tissus associés au tractus où elles seront reconnues comme soi par le système immunitaire. Les spores qui sont restées dans le lumen intestinal vont suivre le transit jusque dans le côlon. Les conditions physico-chimiques de l'environnement devenant difficiles pour leur croissance, ces souches de *Bacillus* vont sporuler à nouveau avant d'être excrétées<sup>51</sup>.

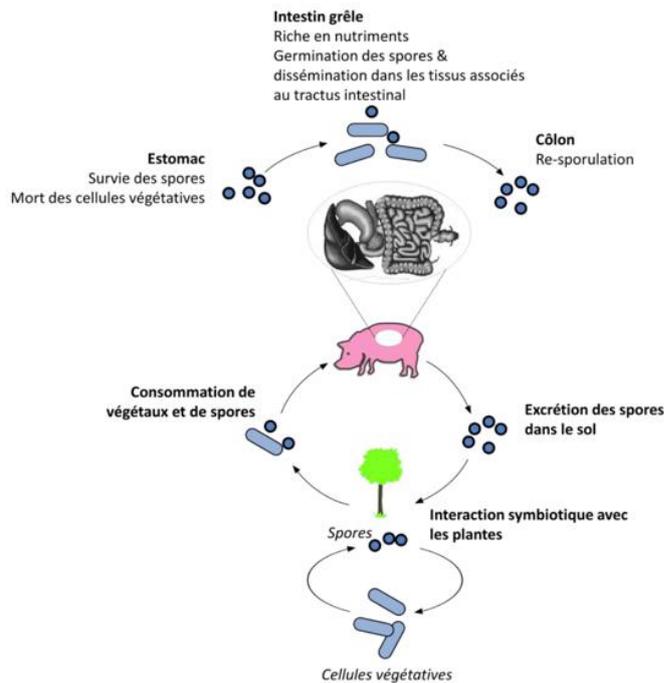


Figure 2 : Cycle de vie de *Bacillus subtilis* dans l'environnement<sup>52</sup>

Une étude réalisée sur des porcs dont l'alimentation a été supplémentée avec des spores de *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* probiotiques, a mis en évidence que 70 à 90% des spores allaient repasser sous forme végétative dans la partie supérieure du tractus gastro intestinal des animaux, et ceci bien que les souches ne colonisent pas entièrement le tractus<sup>53</sup>. Un autre avantage des bactéries du genre *Bacillus* par rapport aux bactéries lactiques est lié à leur capacité à sécréter des sidérophores capables de chélater l'ion  $Fe^{3+}$  et à rendre ce dernier assimilable par les systèmes de transport actif de l'hôte (à pH = 7, l'ion  $Fe^{3+}$  est insoluble)<sup>54</sup>. Cependant, en raison de la production d'entérotoxines par certaines sous espèces de *Bacillus*, notamment *Bacillus cereus*, les doutes sur l'utilisation de ce genre bactérien en tant que probiotique sont encore d'actualité<sup>55</sup>. Le **Tableau 3** regroupe les principaux produits commerciaux contenant une ou plusieurs souches de *Bacillus* reconnues.

Tableau 3 : Liste non exhaustive des principaux produits commerciaux contenant un ou plusieurs souches de *Bacillus probiotique* <sup>52</sup>

| Produit                    | Fabriquant  | Souches  |
|----------------------------|---|--|
| Bactisubtil <sup>®</sup>   | Produit par Marion Merrell, Levallois-Perret, France, mais aussi par Hoechst puis Aventis Pharma. Egalement produit par Casella-Med, Cologne, Allemagne | <i>Bacillus cereus</i> IP5832b (déposé à l'origine comme <i>Bacillus subtilis</i> )                                    |
| Bio-Kult <sup>®</sup>      | Protexin Health Care, Somerset, Royaume Uni   | <i>B. subtilis</i>   |
| Biosporin <sup>®</sup>     | Biofarm, Ukraine  | <i>Bacillus subtilis</i> 2335<br><i>Bacillus licheniformis</i> 2336  |
| Biovicerin <sup>®</sup>    | Geyer Medicamentos S.A. Porto Alegre, Brésil  | <i>Bacillus cereus</i> GM  |
| Bispan <sup>®</sup>        | Binex Co. Ltd., Busan, Corée du sud   | <i>Bacillus polyfermenticus</i> SCD  |
| Domuvar                    | BioProgress SpA, Anagni, Italie   | <i>Bacillus clausii</i> (déposé à l'origine comme <i>Bacillus subtilis</i> )   |
| Enterogermina <sup>®</sup> | Sanofi Synthelabo SpA, Milan, Italie  | <i>Bacillus clausii</i> O/C<br><i>Bacillus clausii</i> N/R<br><i>Bacillus clausii</i> T<br><i>Bacillus clausii</i> SIN |
| Sustenex <sup>®</sup>      | Ganeden Biotech Inc., Ohio, USA   | <i>Bacillus coagulans</i> GanedenBC <sup>30</sup>  |

#### 1.2.4 Les levures

*Saccharomyces* est un genre de levure bourgeonnante. Les levures font également partie du système microbien résiduel du microbiote intestinal. L'espèce *Saccharomyces cerevisiae* est très répandue dans la nature et peut être trouvée dans les plantes, les fruits et le sol <sup>34</sup>. C'est une espèce qui a un rôle clé dans les processus de fermentation des aliments. Une souche de *S. boulardii* considérée comme un biotype de *Saccharomyces cerevisiae*, est couramment utilisée comme probiotique dans l'alimentation humaine et animale <sup>56</sup>.

### 1.3 Règlementations

Une grande variété d'espèces microbiennes est utilisée dans la production de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux. Certains sont utilisés depuis plusieurs décennies dans des domaines divers et variés, touchant la santé des animaux et des hommes, mais aussi pour la préservation des aliments, tandis que d'autres sont moins bien compris et leur utilisation suscite des préoccupations quant à leur innocuité. Des outils sont progressivement développés par l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments) pour tenter de fixer les priorités pour évaluer les risques mais aussi la sécurité des micro-organismes utilisés dans la production d'aliments destinés à l'homme ou aux animaux.

Le système QPS pour « présomption d'innocuité qualifiée » mis en place par l'EFSA pour garantir la sécurité de ces microorganismes ou leur produits métabolique avant la mise sur le marché. Ce système permet d'évaluer l'innocuité de chaque groupe taxonomique (genre ou

groupe d'espèces apparentées) essentiellement sur la base de critères permettant d'établir une identité, de définir des connaissances, de la pathogénicité éventuelle et de l'utilisation finale. Le statut de QPS est donc attribué à tous les microorganismes dont la sécurité ne soulève aucun doute pour la définition de ces critères. De ce fait, le statut QPS peut être attribué aussi bien aux microorganismes ne présentant pas de danger, qu'à ceux dont la sécurité n'est pas garantie mais qui peuvent être définis ou exclus. Toute souche de micro-organisme dont l'identité est établie sans ambiguïté et assignée à un groupe QPS, serait exemptée de la nécessité d'une évaluation plus approfondie de l'innocuité autre que la satisfaction des qualifications spécifiées. Les micro-organismes qui ne conviennent pas au QPS continueraient de faire l'objet d'une évaluation complète de l'innocuité<sup>14,57</sup>.

Alors que le concept probiotique avait déjà été introduit au début du 20<sup>e</sup> siècle par Elie Metschnikoff<sup>58</sup>, les scientifiques ont montré au cours des deux dernières décennies un regain d'intérêt pour les propriétés bénéfiques de certains micro-organismes. Cela a entraîné le développement d'une large gamme de produits contenant des probiotiques dont l'innocuité n'est pas clairement prouvée. Aux États Unis, le FDA (Food and Drug Administration) a mis en place un outil permettant de classer un microorganisme comme un additif sur la base des données relatives à la sécurité et à l'efficacité. La substance ou le microorganisme concerné obtient alors le statut de GRAS (Generally Recognized As Safe) lorsque son historique d'utilisation est sûr dans l'alimentation datant d'avant le 1<sup>er</sup> janvier 1958, soit il a été reconnu par des spécialistes comme étant « qualifiés de sûr » dans les conditions d'utilisation prévues. En pratique, ce statut permet de faire abstraction des étapes d'approbation existantes. Cela signifie dès lors, que le producteur est le seul responsable de la sécurité du produit. L'approche GRAS est certes flexible mais seul le FDA est l'organisme habilité à accepter ou à rejeter l'avis d'un expert quant à l'innocuité du produit contenant ces microorganismes.

En outre, le statut GRAS autorise uniquement l'utilisation du microorganisme dans un contexte ou dans un seul produit. Ainsi, *Bifidobacterium lactis Bb12* et *Streptococcus thermophilus Th4* sont considérés comme GRAS pour leur utilisation spécifique dans les préparations destinées aux nourrissons<sup>59</sup>.

Les produits entrant dans la formulation d'aliments pour animaux incluant les microorganismes sont réglementés par le règlement (UE) n° 1831/2003<sup>57</sup>. Selon le règlement de la directive n°2001/79/CE, la sécurité des micro-organismes utilisés comme additifs alimentaires doit être pertinente pour l'animal, l'opérateur et/ou l'utilisateur et le consommateur. La sécurité doit être démontrée à l'aide de tests et d'études spécifiques. Les souches produisant des toxines ou avec des facteurs de virulence connus ne sont pas autorisées. Les souches ne doivent pas produire de substances antibiotiques destinées à être utilisées en médecine humaine ou animale et ne doivent pas être porteuses de gènes de résistance transmissible<sup>59</sup>.

#### **1.4 Applications des probiotiques**

Les probiotiques font l'objet de nombreuses recherches démontrant la diversité de leurs effets bénéfiques associés à leur utilisation<sup>60</sup>. Ces effets peuvent être classés en deux groupes : des effets pour assurer l'équilibre de la microflore intestinale et des effets thérapeutiques. La **Figure 3** illustre la diversité des effets bénéfiques sur la santé.

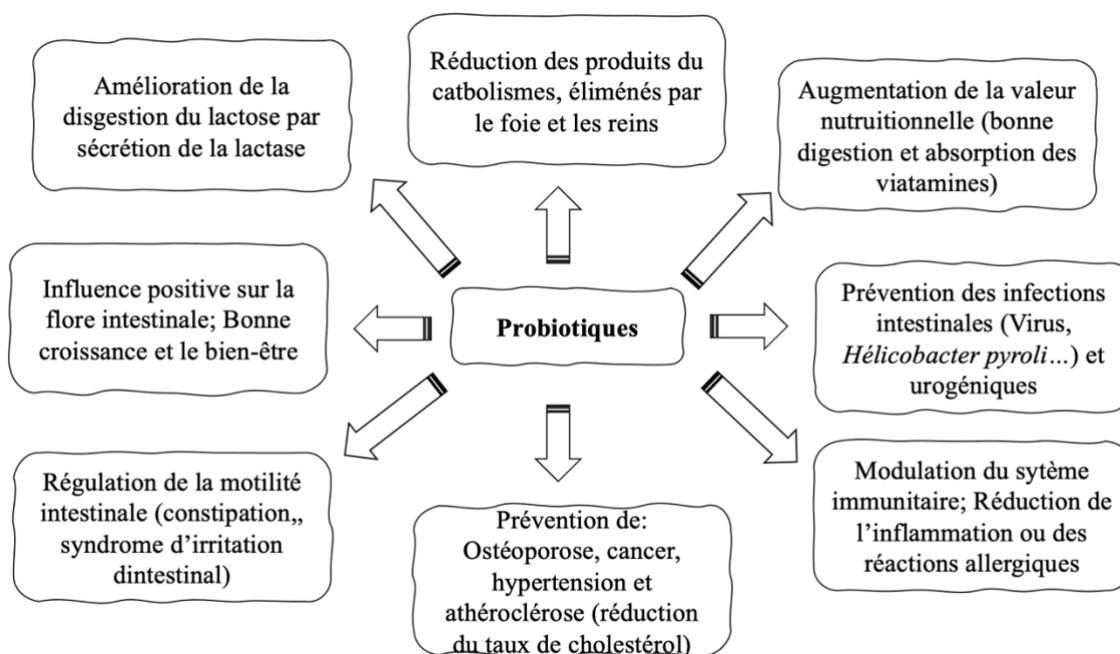


Figure 3 : Les principaux effets bénéfiques des probiotiques en santé humaine et animale <sup>61</sup>

#### 1.4.1 Les probiotiques en santé humaine

Les interactions entre les probiotiques et les cellules du système immunitaire sont essentielles pour le maintien de l'homéostasie des tissus muqueux et de l'immunité innée <sup>62</sup>. Certaines femmes prennent des probiotiques pour rétablir l'équilibre de leurs flores génitales <sup>63</sup>. Il a également été suggéré que les probiotiques sont capables de réduire l'incidence et la sévérité d'entéocolites nécosantes chez le nourrisson le risque de cancer colorectal, les symptômes associés au syndrome du côlon irritable. <sup>64</sup>. Pour améliorer l'intolérance au lactose et lutter contre les troubles digestifs, les probiotiques sont quelques fois sollicités pour leur apport en b-galactosidase <sup>65,66</sup>. Les industries alimentaire et pharmaceutique exploitent régulièrement le potentiel des principaux microorganismes probiotiques (*Saccharomyces boulardii*, les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*) <sup>67</sup>. Dans le cas de la prévention de divers types de diarrhées ou des infections à *Clostridium difficile*, le *Saccharomyces boulardii* est principalement utilisé <sup>68</sup>. D'autres études ont révélé les propriétés d'immunostimulation et de résistance au transit digestif (résistance à l'acidité, à la bile) de la souche de levure *Kluyveromyces lactis* qui sont encourageants <sup>69</sup>. Actuellement, les maladies inflammatoires du tube digestif (la maladie de Crohn ou encore des entérites) provoquant des douleurs abdominales, des symptômes extrêmes et désagréables sont atténués grâce au traitement impliquant une souche d'*E. coli Nissle* 1917. Une souche de *Bifidobacterium lactis* NCC2818 issu de la collection de probiotiques chez Nestlé a montré un effet positif sur le traitement des allergies saisonnières de rhinite <sup>49</sup>. Dans le traitement de la carie, certaines souches probiotiques se sont avérées efficaces. Par exemple la nisine produite par *Lactococcus lactis* a une activité *in vitro* inhibitrice sur l'adhésion de *Staphylococcus mutans* ainsi que certains paradontopathogènes <sup>70</sup>.

## 1.4.2 Probiotiques en agronomie

L'utilisation des probiotiques a été étendue aux animaux et aux plantes pour la sécurité et la qualité des aliments. Ils sont utilisés pour lutter contre les agents pathogènes qui causent des maladies chez les plantes et les animaux d'élevage en particulier<sup>71</sup>.

### 1.4.2.1 Probiotique en élevage

L'équilibre du microbiote intestinal constitue une barrière incontournable dans la colonisation des germes pathogènes en produisant des substrats métaboliques (par exemple, des vitamines et des acides gras à chaîne courte) et stimule les réponses immunitaires non inflammatoires<sup>72</sup>. L'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance, de lutte contre les entérites nécrotiques dans la production animale a été interdite dans de nombreux pays à cause du phénomène de transfert de l'antibiorésistance que ces substances peuvent provoquer<sup>73</sup>. Cela a permis aujourd'hui d'explorer de nouvelles pistes comme l'utilisation de probiotiques pour tenter de contrer la recrudescence des infections causées notamment par les pathogènes du genre *Campylobacter* ou *Salmonella*<sup>18,60</sup>. Ces probiotiques sont capables d'impacter positivement les performances et le bien-être animal par la modulation du tractus gastro-intestinal. Plusieurs genres bactériens sont testés, par rapport à leur présence naturelle dans l'environnement des animaux (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*) ou par rapport à leurs propriétés antibactériennes décrites chez d'autres animaux (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*)<sup>75,76</sup>. Dans le domaine de l'aquaculture, des essais ont permis de valider la capacité inhibitrice de quelques-unes des souches probiotiques (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Vibrio alginolyticus*, certains *Bacillus*, *Flavobacterium*)<sup>77</sup>. Les probiotiques sont utilisés dans l'alimentation pour animaux afin d'améliorer et de maintenir leur croissance, leur rendement et leur protection contre les pathogènes entériques<sup>78</sup>.

### 1.4.2.2 Probiotiques pour les plantes

Le secteur agricole est confrontés à de nombreux défis liés au phénomène de changement climatique et de l'inflation démographique. Le recours à des technologies innovantes et durables est donc nécessaire. L'une des solutions les plus prometteuses actuellement est l'utilisation de microbes associés aux plantes de type probiotique qui aident à limiter les pertes de rendement et la préservation de la qualité des cultures<sup>79</sup>. L'une des particularités des probiotiques végétaux est la lutte directe contre les ravageurs potentiels grâce aux biopesticides qu'ils produisent<sup>1</sup>. De nombreuses espèces microbiennes appartenant aux genres *Klebsiella*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Caulobacter*, *Azospirillum*, *Serratia*, *Azotobacter* et les genres fongiques tels que *Ampelomyces*, *Coniothyrium* et *Trichoderma* sont maintenant bien connues pour promouvoir la croissance des plantes<sup>80</sup>. L'espèce *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus subtilis* par exemple ont montré, en plus de leur rôle dans la formulation de biopesticides, leur impact indirect (réduction des infections par les insectes, solubilisation ou complexation des minéraux (fer, phosphate) ou direct (augmentation de la nodulation) sur la croissance des plantes<sup>81</sup>. Cependant, leur spectre d'action et leur efficacité à courts termes restent encore controversée malgré leur avantage écologique<sup>82</sup>.

L'industrie des probiotiques végétaux destinés au secteur agricole connaît une croissance spectaculaire d'environ 10% par an. Ils sont utilisés comme biofertilisants, renforçateurs de plantes, phytostimulateurs et biopesticides leur mode d'action<sup>83</sup>. Contrairement aux pesticides et engrais chimiques, les probiotiques végétaux sont plus sûrs avec des dommages

environnementaux réduits, moins de risques pour la santé humaine, une activité plus ciblée, efficaces en petite quantité, ils se multiplient en fonction des populations microbiennes indigènes. Ils se décomposent plus vite que les pesticides chimiques conventionnels avec des phénomènes de résistances rarement observés en raison de leur mode d'action multiple.

### 1.5 Mécanisme d'action des probiotiques

L'un des plus grands avantages des probiotiques est leur polyvalence, qui se manifeste de trois manières. Ils enrichissent la microflore intestinale, soutiennent le système immunitaire et agissent directement sur l'agent pathogène<sup>84</sup>. Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de transporter les substances actives produites (enzymes, composants de paroi, substances antimicrobiennes) pour atteindre leurs cibles dans le tractus digestif. Leurs mécanismes d'actions sur l'hôte sont complexes, souvent multiples et dépendent de la souche bactérienne considérée. Ils agissent en particulier, en: (i) inhibant les bactéries indésirables, (ii) neutralisant les produits toxiques, (iii) améliorant la digestibilité alimentaire et en (iv) stimulant l'immunité innée ou adaptative<sup>61</sup>. Les probiotiques doivent ainsi être en contact direct avec les différents constituants de la barrière intestinale, tels que la microflore endogène, le mucus intestinal, les cellules épithéliales, les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages, les lymphocytes B et T (incluant les cellules T régulatrices), et les cellules NK<sup>85</sup>. Une illustration de ces mécanismes d'actions est schématisée à la **Figure 4**.

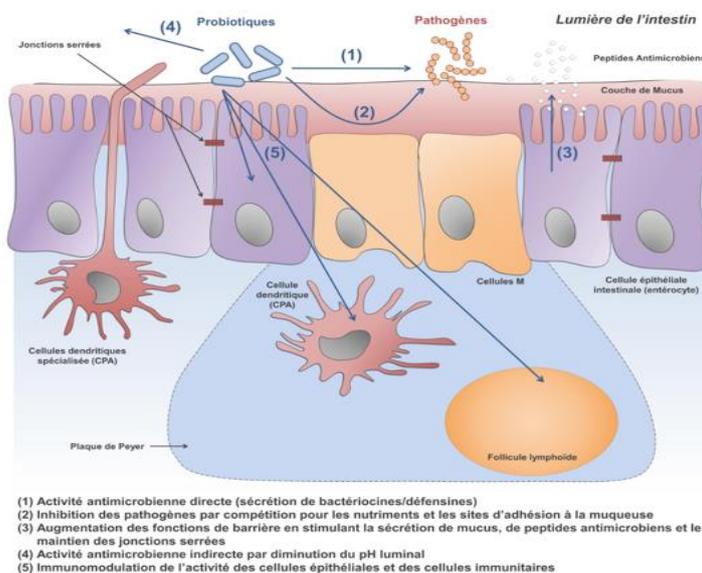


Figure 4 : Représentation schématique des mécanismes d'action des probiotiques<sup>52</sup>

#### 1.5.1 Effet barrière

Plusieurs hypothèses font l'objet de débat sur la contribution des probiotiques dans les mécanismes de maintien de l'effet barrière de la muqueuse intestinale<sup>86</sup> (**Figure 4**). La modification de la sécrétion du mucus ou du signal de la protéine kinase C, du chlorure, ou à des changements dans l'expression des protéines de jonctions serrées ou des mucingènes (grande protéine glycosylée exprimée par les cellules épithéliales<sup>87</sup>), pourrait être du ressort des probiotiques<sup>88</sup>.

### 1.5.2 Effet d'immunomodulation

La plupart des cellules du système immunitaire se retrouvent dans le tractus intestinal. Celui-ci joue un rôle déterminant dans la régulation du système de défense immunitaire en présence des probiotiques. Les cellules impliquées sont les cellules épithéliales intestinales, les cellules dendritiques et les lymphocytes B et T<sup>52</sup>. Le terme "immunomodulation" a été adopté à dessein pour indiquer que la suppression de certaines fonctions immunitaire pour limiter des phénomènes inflammatoires.

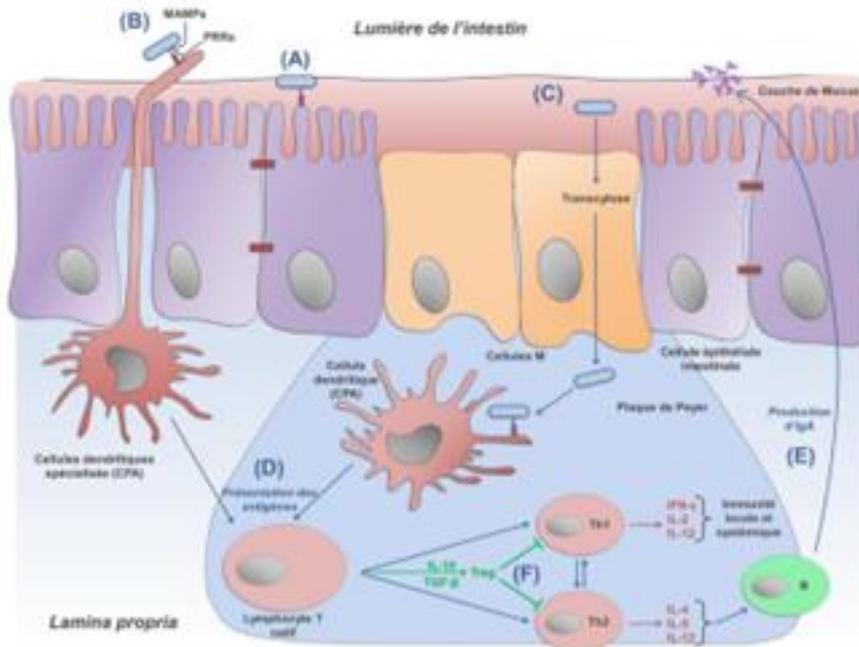


Figure 5 : Représentation schématique des mécanismes d'immunomodulation induits par les probiotiques au niveau du muqueuse intestinale.

### 1.5.3 Interaction plante-microorganisme

L'interaction plante-microorganisme est le principal mécanisme d'action des probiotiques chez les plantes<sup>89</sup>. Ce mécanisme d'action peut varier d'un pathosystème à un autre<sup>90</sup>. Cependant, pour toutes les interactions plantes-microbes réussies, la colonisation des habitats végétaux est le plus remarquable<sup>91</sup>. Les étapes de la colonisation comprennent notamment la reconnaissance, l'adhésion, l'invasion (seulement les endophytes et les agents pathogènes), la colonisation et la croissance. De plus, l'intensité, la durée et les résultats des interactions plantes-microbes sont considérablement influencés par la conformation des populations microbiennes adhérentes<sup>92</sup>. Des exemples de colonisation réussie de la rhizosphère par deux souches du genre *Pseudomonas* sont présentés à la Figure 5.

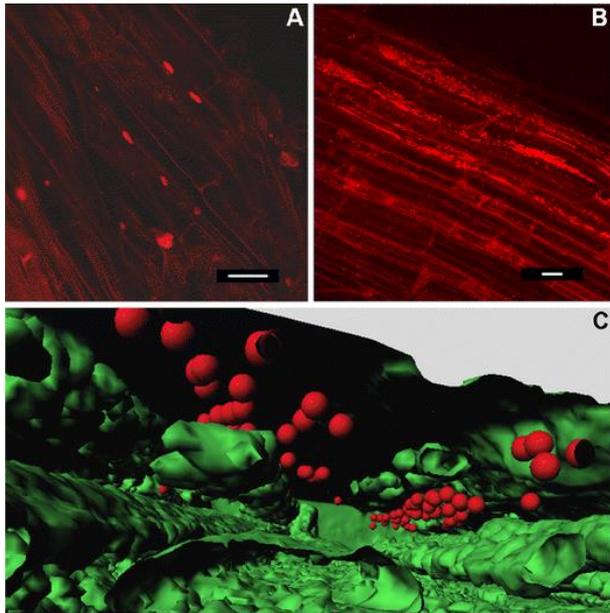


Figure 5 : Microscopie confocale à balayage laser de racines de betteraves sucrières de 3 semaines colonisées par des bactéries marquées DsRed2 : A *P. fluorescens* L13-6-12 et B *P. trivialis* RE\*1-1-14. C reconstitution tridimensionnelle d'une coupe transversale d'une zone densément colonisée par *P. trivialis* RE\*1-1-14 avec Imaris® 6.0 (Bitplane AG, Zürich)

Les interactions bénéfiques entre les organismes eucaryotes et les probiotiques ont évolué, grâce aux nombreuses voies métaboliques microbiennes observées au profit de l'hôte<sup>93</sup>. Leur survie mutuelle se produit à partir du don d'une partie du métabolite de l'hôte pour favoriser la croissance microbienne qui en retour produit des composés qui améliorent la performance de l'hôte **Figure 6**. La production de ces types de métabolites qui induisent une tolérance au stress biotique et abiotique chez l'hôte est une caractéristique clé d'un probiotique<sup>94</sup>.

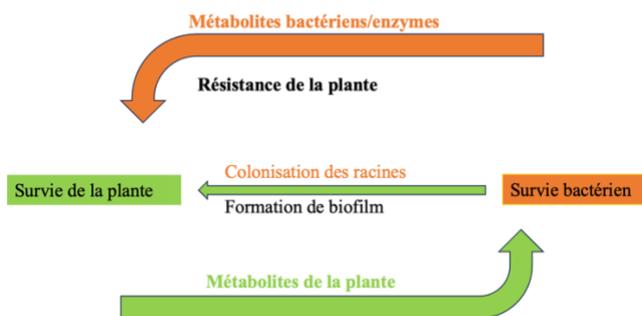


Figure 6 : Diagramme de l'interaction positive de base entre le métabolisme de la plante et ses colonisateurs racinaires de type probiotique<sup>1</sup>.

#### 1.5.4 Activité antimicrobienne

Les bactéries probiotiques développent des activités antibactériennes en inhibant l'adhésion des pathogènes aux cellules intestinales en produisant des bactériocines ou en modifiant les conditions physiologiques (pH, potentiel redox, production de sulfure d'hydrogène) de leur environnement<sup>95</sup>. Les bactéries associées aux plantes peuvent réduire l'activité des microorganismes pathogènes non seulement par des antagonismes microbiens, mais aussi en

activant la plante pour mieux se défendre. L'antagonisme microbien comprend (1) l'inhibition de la croissance microbienne par des antibiotiques diffusibles et des composés organiques volatils (COV), des toxines et des biosurfactants (antibiose), (2) la compétition pour les sites de colonisation et les nutriments, (3) la compétition pour les minéraux, par exemple pour le fer par la production de sidérophores ou de systèmes efficaces d'absorption des sidérophores, (4) la dégradation des facteurs de pathogénicité de l'agent pathogène tels que les toxines, et (5) le parasitisme qui peut impliquer la production extracellulaire d'enzymes dégradant la paroi comme les chitinases et la  $\beta$ -1,3-glucanase<sup>96</sup>.

### 1.5.5 Colonisation et compétition

Il est bien connu que le microbiote dans le tractus gastro-intestinal des animaux peut être modifié, par exemple, par l'ingestion de probiotiques. Par conséquent, l'apport en microorganismes bénéfiques comme les probiotiques permet de réduire ou d'éliminer l'incidence des agents pathogènes opportunistes<sup>77</sup>. Les probiotiques sont capables de coloniser le tractus gastro-intestinal lorsqu'ils peuvent y persister longtemps<sup>97</sup>. Le processus de colonisation est caractérisé par l'attraction des bactéries à la surface de la muqueuse, suivie d'une association au sein du gel muqueux ou d'une fixation aux cellules épithéliales. L'adhésion et la colonisation des surfaces de la muqueuse intestinale sont des mécanismes de protection possibles contre les agents pathogènes par compétition pour les sites de liaison et les nutriments,<sup>98</sup> ou la modulation immunitaire<sup>99</sup>.

### 1.6 Critères de sélection des probiotiques

Les propriétés d'un probiotique varient en fonction d'au moins l'espèce mais aussi de la souche. Il est ainsi nécessaire d'identifier les probiotiques jusqu'au niveau de la souche à l'aide de techniques pointues et robustes sur base, par exemple, de leur phénotype et de leur génotype<sup>10</sup>. Des critères définis par la FAO pour la sélection des probiotiques sont consignés dans le **Tableau 4**<sup>100</sup>. Une fois identifiées, les probiotiques doivent être référencées sur la base des règles du Code International de Nomenclature des Bactéries pour uniformiser la compréhension (Nom du genre, nom de l'espèce, identifiant de la souche)<sup>10,101</sup>. L'innocuité des souches est un critère très important au même titre que la viabilité ou le taux de survie cellulaire. Celui-ci demeure essentiel dans la sélection des probiotiques qui doivent avoir une concentration minimale ( $\sim 10^6$  CFU à vérifier) lorsqu'ils atteignent l'intestin. Ils doivent donc résister aux différentes conditions extrêmes du tube digestif (exemple : acidité, enzymes, sels biliaires) de l'hôte<sup>39</sup>. Ainsi, pour garantir leur survie pendant le passage du tractus digestif, les probiotiques sont premièrement criblés pour leur tolérance au pH acide et à la bile. L'adhésion des bactéries probiotiques aux tractus digestifs leur permet de produire durablement des molécules bénéfiques pour l'hôte, mais permet également l'exclusion des pathogènes et une immunostimulation<sup>69,102</sup>.

*Tableau 4 : Principaux critères non exhaustifs de sélection des souches probiotiques selon la FAO<sup>100</sup>*

| Critères | Résultats attendus |
|----------|--------------------|
|----------|--------------------|

|  |  |
|--|--|
| Résistance à l'acidité                                     | Survie au stress acide dans l'estomac et le duodénum   |
| Résistance aux sels biliaires                              | Survie pendant le transit dans l'intestin grêle  |
| Production d'acides en présence de glucose et de lactose   | Résister aux conditions acides dans l'intestin   |
| Adhésion au mucus et/ou aux cellules épithéliales humaines | Colonisation efficace, réduction des sites d'adhésion des pathogènes à la surface : immuno-modulation      |
| Sensibilité aux antibiotiques                              | Croissance en présence d'un grand nombre d'antibiotiques   |
| Activités antimicrobiennes                                 | Inhibition de germes pathogènes  |
| Résistance à la chaleur                                    | Survie pendant les traitements thermiques  |
| Innocuité totale   | Absence de toxines   |
| Bonnes propriétés technologiques                           | Viabilité et stabilité, croissance à grande échelle, survie dans le produit, résistance aux bactériophages |

### 1.7 Identification des probiotiques

Les techniques d'identification bactérienne reposaient auparavant sur des tests biochimiques dans des milieux miniaturisés, nécessitant ensuite une lecture et une interprétation intégrée<sup>103</sup>. Actuellement, les micro-organismes sont mieux identifiés grâce au séquençage des gènes de l'ARNr 16S et de l'ARNr 18S. Ces méthodes initiales d'identification des bactéries issues d'échantillons biologiques ont évolué depuis quelques années. En plus des techniques basées sur des caractéristiques phénotypiques et biochimiques, ce sont rajoutées des techniques de biologie moléculaire et protéomiques telles que le MALDI-ToF/MS<sup>104</sup>. Ces dernières méthodes donnent des résultats beaucoup plus précis dans le typage de genre et la détection des résistances aux antibiotiques, même dans le cas des bactéries non cultivables<sup>102</sup>. Le **Tableau 5** regroupe une liste de méthodes utilisées pour l'identification des microorganismes.

Tableau 5 : Méthodes d'identification microbienne utilisées en microbiologie <sup>105</sup>

| Detection method   | Advantages  | Disadvantages  |
|--|---|--|
| Conventional; culture on microbiological media and identification by biochemical tests | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensitive</li> <li>• Inexpensive</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lengthy and time consuming process</li> <li>• Might require 24–48 h</li> </ul>  |
| Immunological-based methods  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Faster than conventional methods</li> <li>• Can detect both contaminating organisms and their toxins</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Not as specific, sensitive, and rapid as nucleic-acid based detection methods</li> <li>• Require large amounts of antigen</li> <li>• Developed for only a small number of microorganisms</li> </ul> |
| Florescent <i>in situ</i> hybridization (FISH)   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapid detection and identification directly from slide smears</li> <li>• Fast and ease-of use of conventional staining methods combined with specificity of molecular methods</li> </ul>                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Test limited by the availability of specific antigens for detection</li> </ul>  |
| Molecular based methods<br>(i) Real-time PCR<br>(ii) Multiplex-PCR                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Culturing of the sample is not required</li> <li>• Specific, sensitive, rapid, and accurate</li> <li>• Closed-tube system reduces the risk of contamination</li> <li>• Can detect many pathogens simultaneously</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• A highly precise thermal cycler is needed</li> <li>• Trained laboratory personnel required for performing the test</li> </ul>   |
| DNA sequencing   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 16S rDNA and 18S rDNA sequencing are the gold standards</li> <li>• Can identify fastidious and uncultivable microorganisms</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Trained laboratory personnel and powerful interpretation softwares are required</li> <li>• Expensive</li> <li>• Not suitable for routine clinical use</li> </ul>                                    |
| Microarrays  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Large scale screening system for simultaneous diagnosis and detection of many pathogens</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Expensive</li> <li>• Trained laboratory personnel required</li> </ul>   |
| Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Can generate large copies of DNA in less than an hour</li> <li>• Easy to use</li> <li>• No sophisticated equipment is required</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Developed for only a small number of microorganisms as yet</li> </ul>   |
| Metagenomic assay  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Useful for random detection of pathogens</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Data acquisition and data analysis is time consuming</li> <li>• Trained laboratory personnel required</li> </ul>  |
| MALDI-TOF MS   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fast</li> <li>• Accurate</li> <li>• Less expensive than molecular and immunological-based detection methods</li> <li>• Trained laboratory personnel not required</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• High initial cost of the MALDI-TOF equipment</li> </ul>   |

### 1.7.1 Identification par spectrométrie de masse MALDI-ToF MS

Les premières études sur l'identification des microorganismes au moyen des méthodes analytiques MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization, Time-of-Flight Mass Spectrometry) ont commencé dans les années 1990. La création de la base de données a permis la commercialisation du premier programme de routine en 2008 comme système modèle d'identification pour les laboratoires d'analyses médicales <sup>10</sup>. Alors que les techniques traditionnelles d'identification des différentes bactéries sont basées sur leurs aspects phénotypiques, il est désormais possible d'identifier rapidement les micro-organismes en analysant directement leurs protéines à l'aide de MALDI-ToF MS (**Figure 7**)<sup>118,119</sup>.

#### 1.7.1.1 Principe de base

La spectrométrie de masse consiste à séparer et à identifier des molécules selon leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Elle est utilisée dans de nombreux domaines scientifiques tels que la biotechnologie pour l'analyse des peptides ou oligonucléotides, la pharmacologie pour le dosage de médicaments, l'environnement pour l'analyse de l'eau, et les études cliniques pour la recherche de médicaments.

- MALDI

La molécule à identifier ou l'analyte est d'abord co-cristallisé avec un petit composé organique (matrice) pour le protéger du contact direct avec le faisceau ionisant et l'empêcher de se dégrader. Cette matrice va ensuite absorber les radiations laser UV et transférer l'énergie aux protéines qui s'ionisent. Les ions positifs formés vont être accélérés dans un champ électrique. Un courant à haut tension appliqué pour accélérer les particules chargées.

- La matrice

La matrice est composée de molécules cristallines dont les plus couramment utilisées sont l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), l'acide sinapinique et l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA)<sup>103</sup>. Ces molécules sont ajoutées à un solvant (acétonitrile, éthanol ou acide trifluoroacétique). Le DHB convient à l'analyse d'échantillons organiques hydrophobes ou de polymères aromatiques, tandis que l'acide sinapinique et l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique conviennent à l'analyse des protéines.

- ToF/MS

Après avoir traversé le champ électrique, les ions pénètrent dans le tube quelques nanosecondes après l'ionisation et sont séparés selon leur rapport m/z. Un analyseur de temps de vol détecte alors le passage de chaque ion et génère des pics qui correspondent chacun à la masse spécifique de la particule du spectre obtenu. Ces informations sont ensuite comparées à une base de données pour l'identification de la molécule.



Figure 7 : Spectromètre de masse Brucker Autoflex speed et son système informatique <sup>6</sup>

### 1.7.1.2 Application à l'identification des probiotiques

L'identification des micro-organismes par spectrométrie de masse MALDI-ToF se fait soit en comparant la masse des peptides d'un organisme inconnu avec ceux contenues dans la base de données, soit en appariant les masses de biomarqueurs d'organismes inconnus avec la base de données des protéomes. Le profil caractéristique des protéines ribosomales (environ 60 à 70 % du poids sec d'une cellule microbienne) avec une gamme de masse typique m/z de 2 à 20 KDa<sup>107</sup> est considéré pour l'identification au niveau de l'espèce microbienne en faisant correspondre son profil PMF (peptide mass fingerprint) avec les FMP des protéines ribosomales contenues dans une vaste base de données ouverte. C'est une approche simple qui peut être facilement mise en œuvre dans un laboratoire de diagnostic microbien, soutenue par la disponibilité de nombreuses bibliothèques commerciales de FMP d'organismes<sup>108</sup>(**Figure 8**).

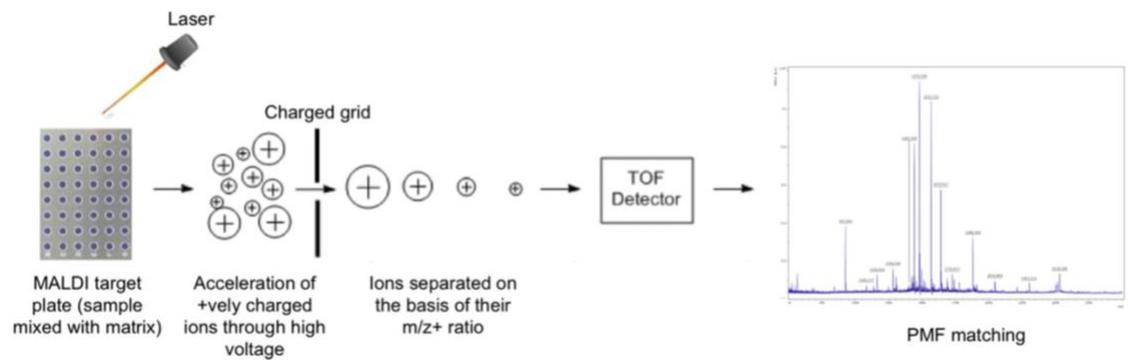


Figure 8 : Processus schématique pour l'analyse au MALDI-ToF/MS

## **Matériel et Méthodes**

## 2 Matériel et Méthodes

La majorité du travail a été réalisée au centre de recherche scientifique et d'enseignement « Terra » de l'Université de Liège. Toutes les étapes impliquant l'utilisation de milieu de culture solide et liquide stérile et l'ensemencement ont été réalisées sous une hotte à flux laminaire préalablement désinfectée au Bacillol. Toute la verrerie a été autoclavée avant d'être utilisée. Les analyses des isolats par spectrométrie de masse MALDI-ToF-MS ont été effectuées à la plateforme REALCAT de l'Unité Mixte de Recherche transfrontalière (UMRt) BioEcoAgro de l'Université de Lille. Le séquençage par l'ARN 16s est effectué par un laboratoire spécialisé en Allemagne (nom si possible).

### 2.1 Matériel

#### 2.1.1 Échantillonnage

Les différents échantillons biologiques (**Tableau 6**) sources de probiotiques proviennent du Maroc, et ce, dans le cadre du projet URBANE pour lequel l'Université de Liège est partenaire (<https://urbane-project.eu/wp-urbane/>). L'état physique et le nom des échantillons sont repris dans le **Tableau 6**. Leur transport de la zone de prélèvement jusqu'au laboratoire s'est fait dans des contenants dédiés. Le matériel technique utilisé pendant toute la période de travail est fourni par le laboratoire d'accueil (**Tableau 7**).

Tableau 6 : Liste des échantillons bruts issus du Maroc

| Matrice                   | Nature      |
|---------------------------|-------------|
| Vinaigre de cidre         | Liquide     |
| Levain avec du lactosérum | Pâteux      |
| Fromage frais de chèvre   | Pâteux      |
| Fromage frais de vache    | Pâteux      |
| Lait fermenté             | Liquide     |
| Ensilage                  | Solide moux |
| Olive naturel             | Solide      |

Tableau 7 : Liste non exhaustive du matériel technique utilisé tout au long de ces travaux

| Matériel                                  | Caractéristiques            |
|---|-----------------------------|
| Micropipettes                             | 200uL et 1mL                |
| Gaspack                                   | 10 cartons                  |
| Milieus de culture MRS, RCM, M17, MH, BSM | Tout fait ou reconstitué    |
| Incubateur fixe / incubateur agitateur    | Température réglée sur 37°C |
| Centrifugeuse Eppendorf                   | 13000/min                   |

#### 2.1.2 Souches et milieux de cultures

Ce travail a été conduit principalement sur 5 souches parmi les isolats correctement identifiés. Ces 5 souches sont issues des échantillons de levain avec du lactosérum, de lait fermenté et de

fromage frais de chèvre. Les bactéries pathogènes ayant servi à l'étude de l'activité inhibitrice des souches potentielles sélectionnées sont des souches à Gram positif et négatif fournis par le laboratoire du MiPI (**Tableau 8**).

*Tableau 8 : Liste des bactéries pathogènes utilisées pour réaliser l'ensemble des tests d'antagonisme*

| <b>Souche pathogène</b>           | <b>Groupe</b> |
|-----------------------------------|---------------|
| <i>Bacillus cereus</i>            | Gram positif  |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Gram positif  |
| <i>E. coli</i>                    | Gram négatif  |

### **2.1.3 Autres réactifs**

Au cours de la réalisation de ce travail, plusieurs réactifs ont été utilisés notamment le cristal violet à 1%, (SIGMA-ALDRICH, USA) et l'acide acétiques (VWR Chemical, Rosny-Sous-Bois, France) qui ont servir pour le test de la production de biofilm ; le toluène (RPL, Leuven, Belgique) employé pour la détermination de l'indice d'émulsion ; les réactifs d'extraction d'ADN pour le séquençage de l'ADN 16S.

## **2.2 Méthodes**

### **2.2.1 Préparation de milieu de culture**

Les milieux de cultures stériles utilisés pour l'isolement des souches sont sous forme liquide ou solide. Il s'agit de De Man Rigosa et Sharp (MRS)<sup>109</sup>; Reinforced Clostridial Medium (RCM) et M17, mMRS, Bifidus Selective Medium (BSM) et MH<sup>110</sup>. Le milieu (MH) les tests d'antagonisme. Les détails de leur composition sont présents dans l'**Annexe 1**.

### **2.2.2 Culture et isolement des probiotiques**

Les cultures microbiennes ont été réalisées à partir de 7 échantillons de diverses matrices biologiques (**Tableau 6**). Un gramme de chaque échantillon de lait fermenté, de levain avec du lactosérum, de fromage de chèvre, de fromage de vache, d'ensilage de vinaigre de cidre et d'olive naturel a été chacun diluée séparément dans 9mL d'eau peptonée tamponnée stérile. Une série de dilution successive est réalisée puis étalée sur boîte de pétri contenant du milieu gélosé MRS (pour les lactobacilles), BSM, RCM ou mMRS (pour les Bifidobactéries), LB pour ou M17 (pour les Lactocoques et les Entérocoques)<sup>25</sup>. Chaque échantillon est cultivé en anaérobie (dans une jarre pourvue d'un dégazeur) pour maintenir les paramètres optimaux de croissance des probiotiques. Après 24 à 48h d'incubation à 37°C, les colonies présentant des différences phénotypiques (aspects, de couleur et de formes) sont sélectionnées puis repiquées sur le milieu solide correspondant dans le but d'avoir des colonies de souche pure dans les mêmes conditions. La confirmation de l'appartenance des souches au groupe bactérien correspondant s'est faite par des tests d'identifications du génome et de la composition des protéines membranaire.

### 2.2.3 Cinétique de croissance

L'évolution de la croissance des souches dans un bouillon MRS s'est faite en injectant 200µL de chaque culture à une DO de 0,1 dans une microplaque de 24 puits. Chaque souche ainsi que le témoin sont inoculées en trois répétitions. Cette analyse est effectuée sur une durée de 24h grâce à un biolecteur (TECAN Spark® multimode microplate reader) qui mesure les DO<sub>600nm</sub> chaque 10min des cultures soumises à un agitation en mode double orbitale à 37°C avec une amplitude de 1 et une fréquence de 270 rpm <sup>111</sup>.

### 2.2.4 Dénombrement bactérien

La concentration bactérienne a été déterminée en tenant compte des dilutions successives effectuées dans de l'eau peptonée stérile, et les dilutions appropriées sont ensemencées en surface de la gélose MRS et incubées à 37°C pendant 24h dans une jarre sous une atmosphère anaérobie <sup>112,113</sup>. Les unités formant colonies par millilitre (UFC/ml) ont été dénombrées à l'aide d'un comptage manuel de colonies en appliquant l'**Équation 1** <sup>114</sup>.

*Équation 1: Formule du dénombrement bactérien*

$$N = \frac{\sum c}{V_{mL}} \times Fd$$

N : nombre de microorganismes présents dans l'unité de mesure de l'échantillon

c : nombre total de colonies comptées sur une boîte retenue des dilutions effectuées ;

V<sub>mL</sub> : volume de l'inoculum appliquée à chaque boîte en ml ;

Fd : facteur de la dilution retenue

### 2.2.5 Observation macroscopique

La description macroscopique s'est faite sur base d'une observation à l'œil nu des caractéristiques phénotypiques (forme, aspect, couleur). Pour se faire, les échantillons bruts dilués dans de l'eau tamponnée sont ensemencés par stries en trois répétitions sur le milieu adéquat. Après 24h d'incubation à 37°C, les colonies sont observées puis décrites.

### 2.2.6 Observation microscopique

L'examen microscopique s'est fait à partir d'un frottis ou d'une goutte de jeunes cultures déposée sur une lame recouverte d'une lamelle. La lecture s'est faite à l'aide d'un microscope binoculaire doté d'une caméra (Zeiss) pour l'acquisition des images.

### 2.2.7 Conservation des souches d'intérêt

Après purification, les isolats bactériens sont conservés selon deux méthodes : (i) conservation de courte durée qui consiste à ensemencer les isolats sur des gélose MRS, M17 et RCM selon le type de bactéries recherchés. Après incubation à 37°C, les boîtes sont placées à +4°C durant plusieurs semaines ; (ii) conservation de longue durée pour laquelle les isolats bactériens purifiés sont placés dans du milieu liquide MRS, M17 et RCM stérile à 80% et 20% de glycérol <sup>128</sup> puis placés à -80°C dans un congélateur (Ultra low-Temperature U410 premium, Eppendorf Company New Brunswick, Canada,).

## 2.2.8 Identification

La détermination de la taxonomie des souches fait partie des premières étapes importantes de sélection de probiotiques<sup>33</sup>. Deux méthodes d'identification des souches sont utilisées : (i) La spectrométrie de masse MALDI-ToF analysant les protéines spécifiques et (ii) le séquençage d'ADN 16S<sup>8</sup>.

### 2.2.8.1 Identification protéomique par MALDI-ToF MS

L'identification des isolats bactériens a été réalisée par spectrométrie de masse (MALDI-ToF) Microflex L20 (Brucker Daltonics, Allemagne)<sup>115</sup>. Les isolats ayant présenté des différences morphologiques ont été identifiés par cette technique dont le protocole expérimental est décrit ci-après.

#### 2.2.8.1.1 Préparation des isolats pour l'analyse protéomique

Un lot de vingt et une colonies isolées a été soumises à une série de purifications sur milieu MRS agar. À l'aide d'un cure-dent stérile, une petite quantité de biomasse est prélevée (colonies isolées) qu'on dissout dans 200ml d'eau pure avant de rajouter 600ml d'éthanol. Cette étape de lavage est cruciale pour avoir des cellules pures. Ce mélange est par la suite centrifugé à 13000 tours/min pendant 3 min. Le culot recueilli est séché à l'aide d'une étuve à 40°C pendant 5min. Les cellules sont ensuite lysées à l'aide de 50ml d'acide formique et de 50ml d'acétonitrile. Le tout est centrifugé puis 125ml de surnageant sont déposés sur une plaque métallique (**Figure 9**) dédiée à l'analyse spectrométrique. La plaque est laissée sécher sous une hotte à flux laminaire puis un même volume de matrice permettant d'immobiliser les composants est ajoutée dans chaque puit. Il s'agit d'une solution saturée d'acide  $\alpha$ -cyano-4hydroxyciannique (HCCA, Matrix, Brucker Daltonics). La plaque est ensuite séchée à température ambiante puis introduite dans le spectrophotomètre de masse. Les spectres sont enregistrés puis traités<sup>116</sup>.

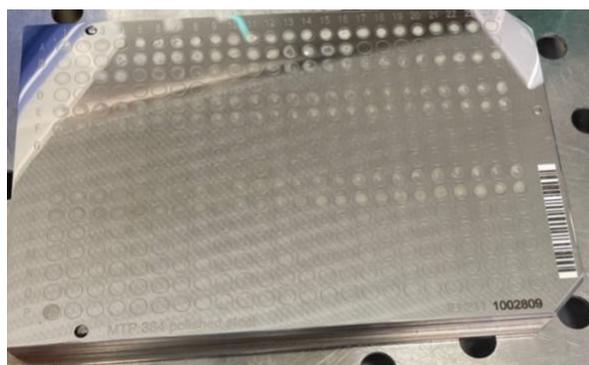


Figure 9 : Plaque métallique dédiée à l'analyse au spectromètre de masse Maldi-ToF comportant les cellules bactériennes recouvertes de matrice prêtes à être identifiées

#### 2.2.8.1.2 Analyse des spectres obtenus

Les spectres de masse MALDI-ToF enregistrés ont été analysés à l'aide du logiciel MALDI-BioTyper 4.0 (base de données MALDI Biotyper 4.0 Brucker Daltonics, Allemagne). La gamme de masses dont les spectres sont analysés est comprise entre 2,000 et 20,000 Da (**Tableau 9**). L'appareil est calibré avec une souche standard d'*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Les

spectres sont comparés aux spectres de référence de la base de données Biotyper, générant ainsi des scores de similarité allant de 0,000 à 3,000 qui indique le degré de confiance dans l'identification<sup>117,118</sup>.

Tableau 9 : Score d'identification des souches bactériennes d'intérêts en comparaison avec les références de la base de données à travers l'identification par spectrométrie de masse MALDI-ToF

| Score         | Couleur | Symbole | Description  |
|---------------|---------|---------|--|
| 2,300 - 3,000 | Verte   | (+++)   | Forte probabilité d'identification de l'espèce                         |
| 2,000 - 2,299 | Verte   | (++)    | Identification du genre sécurisée, identification probable de l'espèce |
| 1,700 - 1,999 | Jaune   | (+)     | Identification probable du genre                                       |
| 0,000 - 1,699 | Rouge   | (-)     | Score insuffisant pour l'identification                                |

### 2.2.8.2 Identification par séquençage d'ADN 16S

L'extraction de l'ADN bactérien s'est faite en utilisant le kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel) suivant le protocole décrit dans le manuel d'utilisation. La pureté et la quantification sont déterminées par le spectrophotomètre Nanodrop à une longueur d'onde de 260nm, 230 et 280nm. Pour ce faire, 2 µL de chaque échantillon sont blanchies avec 2 µL d'eau distillée. Le principe est le suivant : l'absorbance maximale des acides nucléiques est à 260 nm, celle des sels est à 230 et l'absorbance maximale des protéines est à 280 nm. Les rapports 260nm/280nm et 260/230 sont donc utilisés pour déterminer la pureté de l'échantillon. Un rapport situé entre 1,8 et 2 étant considéré ADN à pureté acceptable. Les échantillons ont été vérifiés pour être dans cette intervalle. Enfin, une réaction en chaîne par polymérase (PCR) a été réalisée avec une taq ADN polymérase Q5® High-Fidelity. Les séquences d'amorces utilisées sont : la 16s8F (3'AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG 3') et la 16s1492R (5'ACG-GTT-ACC-TTG-TTACGA-CTT 3'). Le programme de température utilisé consiste en 30 cycles de 10 secondes à 98°C, 30 secondes à 62°C et 1 minute à 72°C. Ensuite, les échantillons ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Les produits pcr purifié sont ensuite envoyés à Eurofin Genomics en Allemagne pour le séquençage de l'ADN 16S. L'identification des séquences obtenues a été réalisées à l'aide de l'outil BLAST (Basic Mocal Alignment Tool) disponible sur le site de la NCBI (National Center for Biotechnology Information) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

## 2.2.9 Caractérisation des souches probiotiques

### 2.2.9.1 Dosage des métabolites produits

Des surnageants de cultures de 18h à 37°C centrifugées à 5000 tours/min pendant 15min puis environ 1µ est filtré avec des filtres de 0,22mm de diamètre, ont été utilisés pour le dosage des acides organiques produits par nos souches d'intérêt. Cette analyse est réalisée à l'aide du HPLC (AGILENT 1200, Californie, USA), la phase mobile : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM, flow : 0,5mL/min, colonne : Aminex HPX-87H, température de la colonne : 50°C, température de la colonne RID : 45°C, volume d'injection : 15µL, temps : 35 min). Le logiciel AGILENT, OPEN LAB CDS 2.3 a permis d'analyser les chromatogrammes en intégrant les airs des pics utiles à la quantification de chaque analyte. Une droite de calibration est ensuite établie pour chacun des

standards à disposition permettant ainsi de connaître la concentration de chaque acide organique dans chacun des surnageants analysés.

### **2.2.9.2 Indice d'émulsion**

A partir d'une culture liquide des souches bactériennes, des surnageants sont obtenus par centrifugation à 5000 tours/min pendant 10min. Cette fraction liquide est par la suite utilisée pour connaître le pouvoir émulsifiant de chacune des cinq (5) souches isolées et identifiées. La méthode utilisée est celle décrite par **Prasanna et al., (2012)**<sup>119</sup>, avec des modifications. Un volume de 5ml de surnageant auquel 5ml de toluène sont ajoutés puis homogénéiser au vortex pendant 1min dans un tube de verre à bouchon à vis (100 mm × 13 mm). L'expérience est répétée 3 fois. L'indice d'émulsion en pourcentage est déterminé par la mesure de la hauteur d'émulsion au temps 0h et après 24h selon la formule suivante :  $he/ht$  où  $he$  correspond à la hauteur de l'émulsion et  $ht$  la hauteur totale du mélange échantillon-toluène. Une analyse de la variance est effectuée pour comparer l'indice d'émulsion à  $t = 0h$  et après 24h.

### **2.2.9.3 Mise en évidence *in vitro* de quelques propriétés physiologiques des probiotiques**

#### **2.2.9.3.1 Résistance au stress thermique**

Les cultures de souches dans du bouillon MRS obtenu après 18h ont été chauffées à 80°C pendant 30min au four à micro-ondes de 220v, 50Hz (2100 W, Memmert 854 Schwabach W-Germany). Après ce traitement thermique, la viabilité des souches bactériennes ( $DO = 1$ ) a été vérifiée par dénombrement de colonies sur gélose MRS incubée à 37°C de 24h à 48h<sup>120,2</sup>.

#### **2.2.9.3.2 Résistance à l'acide et aux sels biliaires**

Les résistances à l'acidité et au sel biliaire sont testées respectivement dans des conditions de pH 2,5 et 6,5 et de concentration en sels biliaires de 1%<sup>121</sup>. La croissance des microorganismes sur MRS et dans ces conditions de stress est suivie dans des micro-puits pendant 24h à l'aide d'un biolecteur (TECAN Spark® multimode microplate reader). Un volume total d'environ 200mL de bouillon MRS avec une DO de 0,1 sont introduits dans chaque puit sous chacune de ces conditions puis les densités optiques à 600nm sont mesurées à chaque intervalle de 10min au cours des 24h d'incubation selon les conditions suivantes : agitation en mode double-orbitale à 1 d'amplitude et 270 rpm de fréquence, température à 37°C et milieu anaérobie.

#### **2.2.9.3.3 Activité antimicrobienne**

Le test d'antagonisme est utilisé pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des isolats. Pour chaque souche étudiée, 10  $\mu$ L à  $10^8$  UFC par ml, est déposé en spot à travers des disques en papier wattman stérile sur une gélose MRS inoculée par la souche indicatrice à une charge de  $10^6$  UFC/ml (pathogènes) en surface de la gélose. Après une incubation de 24h à 30°C, l'activité antibactérienne est mise en évidence par l'apparition d'un halo transparent autour des spots des souches d'intérêt et elle est estimée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition produites en mm<sup>122,123</sup>. Ces séries de tests ont été effectués en trois répétitions.

### 2.2.9.3.4 Test de sensibilité aux antibiotiques

Pour déterminer le comportement de nos souches vis-à-vis de certains antibiotiques, nous avons testés les résistances de ces dernières par diffusion sur la gélose Mueller Hinton (MH) en utilisant des disques d'antibiotiques fournis par le laboratoire du MiPI (**Tableau 10**).

A partir de cultures de nuit dans un bouillon MRS, une concentration d'environ  $10^8$  UFC/ml est étalée de façon homogène sur la gélose MH. Après séchage des boîtes, on dépose stérilement les disques d'antibiotiques à la surface du milieu (5 à 7 par boîtes). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h. Les résultats sont obtenus en mesurant les diamètres des zones claires d'inhibitions <sup>124</sup>. Nous considérons que pour un diamètre inférieur à 15mm, la souche est résistante (R) à l'antibiotique considéré tandis que pour un diamètre supérieur ou égal à 15mm elle est sensible (S) à l'antibiotique <sup>125</sup>.

Tableau 10 : Les différents antibiotiques utilisés pour réaliser un antibiogramme

| Antibiotiques                     | Symboles | Charge par disque | Familles        | Mécanisme d'action                                   |
|-----------------------------------|----------|-------------------|-----------------|--|
| Amoxicilline                      | AX       | 25µg              | Bêta-lactamine  | Inhibiteurs de la synthèse des enveloppes bactériens |
| Amoxicilline + acide clavulanique | AMC      | 20+10µg           |                 |  |
| Céphalotine                       | KF       | 50µg              |                 |  |
| Fosfomycine                       | FOS      | 15µg              |                 |  |
| Gentamycine                       | CN       | 10µg              | Aminoside       | Inhibition de la synthèse des protéines              |
| Néomycine                         | NE       | 30µg              |                 |  |
| Erythromycine                     | E        | 15µg              |                 |  |
| Pristinamycine                    | PT       | 15µg              |                 |  |
| Tétracycline                      | TET      | 30µg              | Fluoroquilonone | Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques     |
| Ofloxacine                        | OFX      | 5µg               |                 |  |
| Ciprofloxacine                    | CIP      | 10µg              |                 |  |

### 2.2.9.3.5 Autoagrégation

Le test d'autoagrégation est réalisé suivant la méthode de Del Re et al (2000) <sup>126</sup> avec quelques modifications. Pour cela, une culture de nuit est réalisée dans du bouillon MRS à 37°C puis centrifugé à 5000g pendant 15min. Le culot est ensuite lavé deux (2) fois au PBS (pH 7,2), puis re-suspendu dans du PBS pour atteindre une absorbance de 1 ( $A_0$ ) correspondant approximativement à une population de  $10^8$  UFC/mL. Environ 4mL de cette nouvelle suspension est homogénéisée pendant 20s puis incubé 5h à 37°C. Dans un intervalle de 1h, un volume de 0,1mL du dessus la suspension est transféré dans 3,9mL de PBS puis l'absorbance est mesurée à 600nm ( $A_t$ ). Le pourcentage d'autoagrégation est déterminé suivant cette formule :  $[1-(A_t/A_0)]*100$  où  $A_t$  représente l'absorbance au temps  $t=1h, 3h, 5h$  et  $A_0$  l'absorbance à  $t=0h$ <sup>126</sup>.

### 2.2.9.3.6 Adhésion au solvant

Pour estimer l'hydrophobicité de surface et prédire la capacité d'adhésion aux solvants hydrophobes, des souches isolées, le « test d'adhésion bactérienne aux hydrocarbures » a été effectué selon la méthode MATS (Microbial Adhesion To Solvent) comme décrite par Rosenberg *et al.*<sup>127</sup>, avec des modifications<sup>128</sup>. Le substrat hydrophobe utilisé est le toluène<sup>129</sup>. Les souches sont cultivées toute une nuit puis lavées deux fois avec du phosphate tamponné salin (PBS) à pH 7 et remises en suspension dans le même tampon. L'absorbance est ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (spectrophotomètre VWR V-1200) à une longueur d'onde de 600 nm pour atteindre une DO de 1 correspondant à une concentration initiale de 10<sup>8</sup> UFC/ml. Dans des tubes expérimentaux, 1ml de toluène ont été ajoutés à 3 ml de la suspension bactérienne. Le mélange est ensuite vortexé pendant 10 secondes et laissé reposer 20 minutes<sup>129</sup>. L'absorbance de la phase aqueuse après décantation a été mesurée pour calculer le pourcentage de cellules retirées du mélange et restant dans l'émulsion trouvée dans la couche supérieure. L'expérience a été réalisée en trois répétitions et l'hydrophobicité de surface en % a été calculée avec l'Équation 2.

Équation 2 : Pourcentage d'hydrophobicité de chacune des souches identifiées<sup>130</sup>

$$\text{Hydrophobicité (\%)} = \frac{(DO_{600nm} \text{ avant mélange} - DO_{600nm} \text{ après mélange})}{DO_{600nm} \text{ avant mélange}} * 100\%$$

### 2.2.10 Analyses statistiques

Le prétraitement et l'analyse des données se sont faits respectivement par les logiciels Microsoft Excel 365 ® et GraphPad Prism9®. Les expériences ont été menées en trois répétitions. Les résultats sont exprimés par les valeurs moyennes des 3 répétitions et sont comparés par analyse de la variance à un critère (ANOVA 1). Les différences sont significatives lorsque le seuil de décision *p* est < 0,05.

## **Résultats et discussions**

### 3 Résultats et Discussions

#### 3.1 Résultats

Les échantillons soumis à cette étude, sont des produits fermentés alimentaires (levain avec du lactosérum, lait fermenté, olive, vinaigre de cidre et fromage frais de chèvre) ou non alimentaires (ensilage) récolté au Maroc et à partir desquels 87 colonies potentiellement différentes sur la base de leur morphologie ont été isolées sur différents milieux sélectifs MRS (pour les *Lactobacillus*), RCM (pour les bifidobactéries) et M17 (pour la recherche d'entérocoques et les lactocoques). Dans l'optique d'établir une carte d'identité spécifique à chaque souche, un lot de vingt et une (21) colonies sur les 87 ont été utilisées pour une identification moléculaire à travers le séquençage de l'ADN16S et par la spectrométrie de masse (MALDI-ToF MS) puis complétée par leur caractérisation du point de vue morphologique (aspect macroscopique et microscopique), physiologique (selon différentes conditions de croissance) et physico-chimique (par une analyse thermogravimétrique, voir **Annexe 4**).

##### 3.1.1 Observations macroscopiques

La caractérisation macroscopique à l'œil nu des différentes colonies isolées a permis de définir leurs caractéristiques morphologiques. Alors que certaines colonies bactériennes présentaient des formes régulières de couleur blanchâtre avec un fond opaque, des bordures arrondies et laiteux (A et C), d'autres étaient dures avec des bordures rugueuses (B). Certaines avaient un aspect gluant et transparents (D et E). D'autres en revanche étaient plus petites avec un contour transparent (F). Un exemple de morphologies différentes des colonies est proposé dans la **Figure 10**.

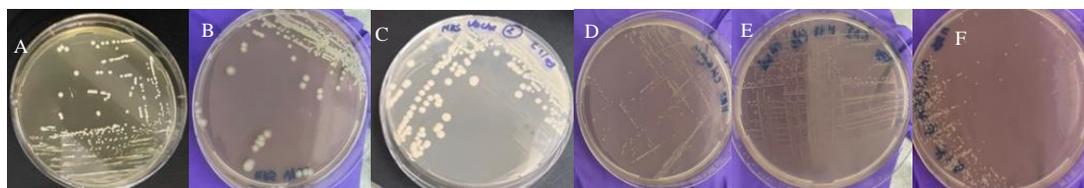


Figure 10 : Aspect macroscopique des souches isolées des matrices étudiées. A : levain avec du lactosérum (MALEM17\_1-1), B : vinaigre de cidre (MAPOM17\_1), C : fromage de vache (MAVAMRS2), D : fromage frais de chèvre (MACHMRS\_1-1), E : lait fermenté (MALAM17\_1-2) et F : olive (MAOLMRS\_1-1)

Chacune des colonies isolées obtenues par la technique d'épuisement sur gélose MRS telle que décrit dans le protocole, présentant des différences morphologiques, ont été sélectionnées pour une observation au microscope optique. Cette analyse révèle, la présence de bactéries de formes arrondies (coques) avec des arrangements variés (chainette, grappe ou diplocoque, et certaines sont en bâtonnet (bacilles).

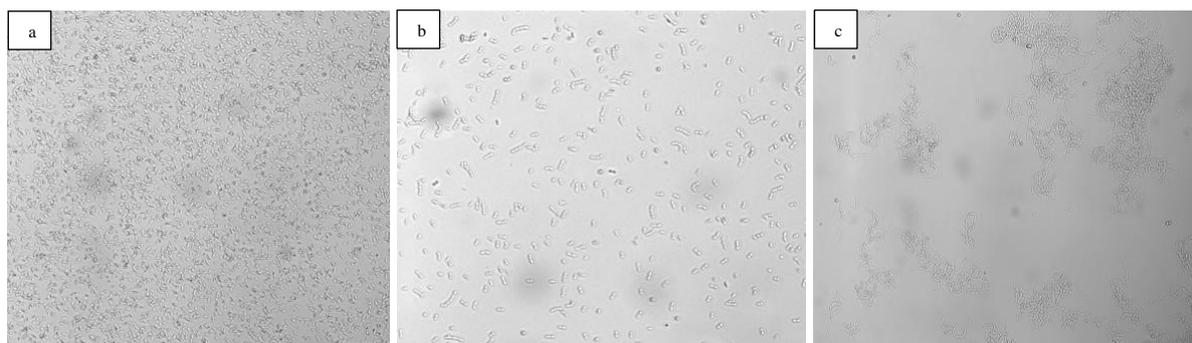


Figure 11 : Aspect microscopique de quelques souches isolées des échantillons de levain avec du lactosérum (a), du fromage de chèvre (b) et de l'ensilage (c) provenant du Maroc

### 3.1.3 Identification par séquençage ADN 16S

Un lot de 21 colonies sur 87 isolées des différentes matrices biologiques sont cultivées dans un bouillon MRS, RCM ou M17. Les culots obtenus par centrifugation à 13000g pendant 3min, sont utilisés pour en extraire l'ADN. Le séquençage s'est fait en appliquant la technique de l'ADN 16S telle que décrite dans le protocole expérimental, a révélé la présence de diverses souches bactériennes dont l'espèce et l'appartenance à un groupe de microorganismes est confirmée par traitement des séquences à l'aide de la banque de donnée NCBI-Blastn. Les résultats obtenus sont consignés dans le **Tableau 11**.

### 3.1.4 Identification par spectrométrie de Masse MALDI-ToF

Chacune des 21 colonies identifiées par le séquençage de de l'ADN 16S, ont été passées au spectromètre de masse pour confirmer les résultats obtenus. Sur la base des scores requis pour une identification fiable (**Tableau 9**), onze (11) souches ont pu être correctement identifiées à partir des isolats bactériens d'une part, et des cultures fraîches dans du bouillon de chaque milieu cible d'autre part. Parmi les 11 souches, cinq (5) sont choisis avec un score supérieur à 2 indiquant une identification sécurisée du genre bactérien. Un seul est considéré comme ayant une identification du genre probable avec un score inférieur 1,70.

Tableau 11 : Liste des souches identifiées par MALDI-ToF et ADN 16S à partir d'échantillons bruts.

| Matrices                  | Code        | ADN16S                                 | %de similarité | MALDI-ToF-MS                           | Score |
|---------------------------|-------------|--|----------------|--|-------|
| Olive naturelle           | MAOLMRS 1   | <i>Bacillus paralicheniformis</i>      | 96,93%         | <i>Bacillus licheniformis</i>          | 2,21  |
| Levain avec du lactosérum | MALEMRS 1_2 | <i>Lactobacillus plantarum</i>         | 99,38%         | <i>Lactobacillus plantarum</i>         | 2,32  |
| Fromage de chèvre         | MACHMRS 1_1 | <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> | 100%           | <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> | 2,2   |
|                           | MACHMRS 2   | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>       | 99,65%         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>       | 2,42  |
| Lait fermenté             | MALAMRS 1_2 | <i>Enterococcus durans</i>             | 100%           | <i>Enterococcus durans</i>             | 2,28  |
|                           | MALAMRS 2_1 | <i>Lactobacillus casei</i>             | 100%           | <i>Lactobacillus casei</i>             | 2,37  |

|             |                                |        |                                |      |
|-------------|--------------------------------|--------|--------------------------------|------|
| MALAM17 1_1 | <i>Enterococcus faecalis</i>   | 100%   | <i>Enterococcus faecalis</i>   | 2,27 |
| MALAM17 2_1 | <i>Enterococcus faecalis</i>   | 96,23% | <i>Enterococcus faecalis</i>   | 2,23 |
| MALAM17 2_2 | <i>Enterococcus faecalis</i>   | 97%    | <i>Enterococcus faecalis</i>   | 2,27 |
| MALAM17 3_1 | <i>Lactobacillus paracasei</i> | 96,89% | <i>Lactobacillus paracasei</i> | 2,27 |
| MALAM17 3_2 | <i>Lactobacillus paracasei</i> | 99,67% | <i>Lactobacillus paracasei</i> | 2,21 |

### 3.1.5 Courbe de croissance

La densité optique à 600 nm des cultures bactériennes est suivie pendant 24h (37°C) dans un bouillon MRS sans ajout de supplément et a permis d'établir un profil de croissance de cinq souches de bactéries lactiques isolées issues aliments fermentés (**Figure 12A**). Ces souches sont choisis sur la base de leur score et des pourcentages d'identité les plus élevés.

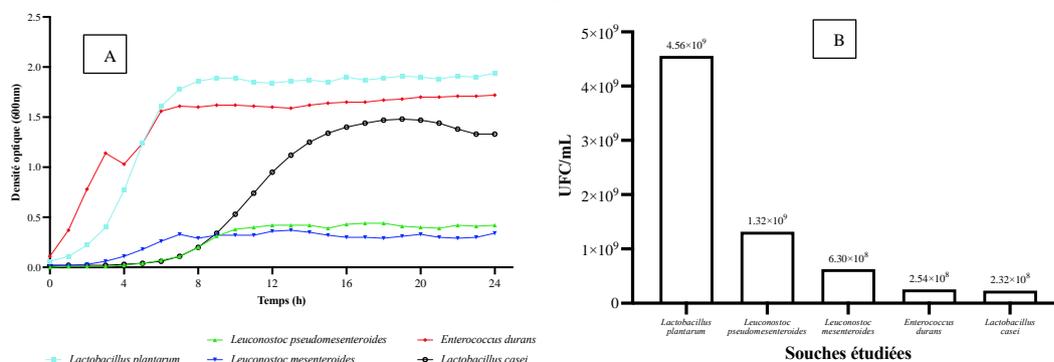


Figure 12 : Courbe de croissance bactérienne de cinq des souches isolées en bouillon MRS à un pH initial de 6,8 ; avec une température de 37°C, en anaérobiose, sous agitation en mode double orbitale (amplitude : 1 mm ; fréquence : 270 tr/min), avec une durée 24h de culture (A). Dénombrement réalisé sur de la gélose MRS dans les mêmes conditions de température et de pH après une pré-culture de 18h dans du MRS liquide (B).

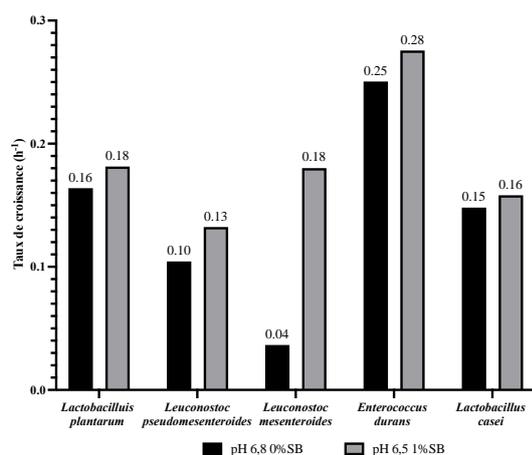


Figure 13: Taux de croissance microbienne par heure en considérant le logarithme des données de la densité optique dans la phase exponentielle pour deux différentes conditions de culture : ■ milieu MRS liquide à pH 6,8 et 0% de sels biliaires (SB) ; ■ milieu MRS liquide à pH 6,5 et 1% de sels biliaires.

Les résultats de la **Figure 12** indiquent un profil de croissance qui diffère d'une espèce à une autre. Excepté *Leuconostoc pseudomesenteroides* et *Lactobacillus casei* qui ont une phase de latence presque identique (croissance ralenti), les quatre autres souches présentent un temps de latence différent. Cette phase est plus courte respectivement pour *Enterococcus durans*, *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc mesenteroides*. *Lactobacillus plantarum* atteint une densité optique maximale de 1,89 après 9h avant de se stabiliser alors que le maximum pour *Enterococcus durans* est de 1,6 après 6h de culture. La valeur de DO la plus grande correspond à celle de *Lactobacillus plantarum* (1,93) en 8h. Quant à la souche de *Lactobacillus casei*, elle présente une valeur maximale de 1,48 alors que sa phase exponentielle qui débute vers 8h de culture et s'achève à +/-15h de culture et est par ailleurs la plus longue. Les deux souches de *Leuconostoc* restent cependant, à des valeurs de densité optique inférieure à 0,5. Le dénombrement par un UFC/mL montre une bonne viabilité de l'ensemble des souches dans les mêmes conditions décrites précédemment. Les valeurs se situent entre  $2.10^8$  et  $5.10^9$  UFC/mL. Concernant le taux de croissance, toutes les souches du genre *Leuconostoc* ont un taux de croissance qui est plus élevé à pH 6,5 et 1% SB que dans les conditions initiales (pH 6,8 et 0%SB) (**Figure 13**).

### 3.1.6 Mesure du pH

L'étude de l'évolution du pH des cinq bactéries lactiques étudiées sur une durée de 72h montre une tendance différente selon la souche (**Figure 14**).

Les souches sont inoculées dans un bouillon MRS à un pH initial 6,8 puis l'évolution du pH est mesurée à différents intervalle de temps (0h, 1h 3h 24h et 72h). *Lactobacillus plantarum* acidifie davantage le milieu et est la seule à atteindre une valeur de pH en deçà de 4 après 24h de culture et reste stable au bout des 72h de culture alors que *Enterococcus durans*, *Lactobacillus casei* et *Leuconostoc pseudomesenteroides* ont un pH qui diminue pratiquement de 2 unité au bout de 24h culture. Cependant, la souche de *Leuconostoc mesenteroides* présente une diminution de pH la plus faible surtout au bout de 24h de culture. Elle atteint ensuite une valeur de pH égale à 4 après 72h au même titre que les quatre autres souches.

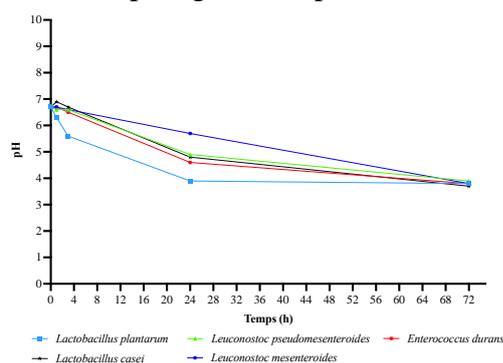
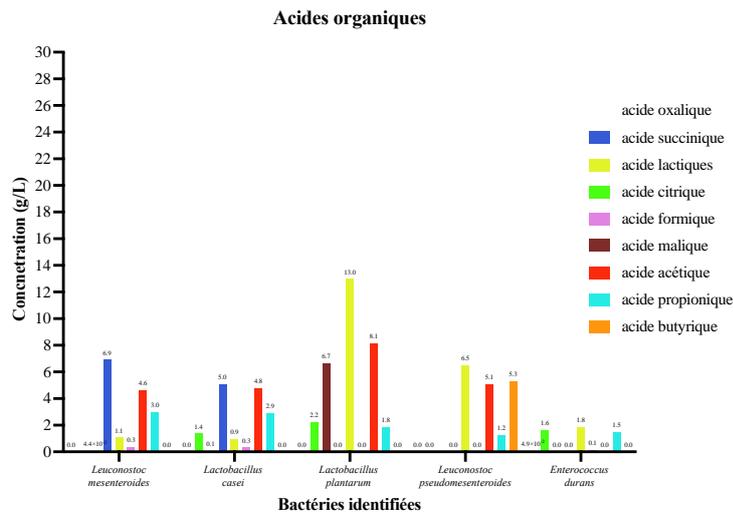


Figure 14 : Mesure de l'évolution du pH au cours d'une culture de 72h à 37°C dans un bouillon MRS à l'aide d'un pH-mètre électronique (doté d'une électrode sentix 41 stockée dans 3mol/l de KCl).

### 3.1.7 Dosage des métabolites par HPLC

Chaque souche de bactéries cultivées en milieu MRS à 37°C est centrifugée (5000g, 10min) puis leur surnageant est filtré avant d'être passé au HPLC pour la quantification des acides gras

à courte chaîne qu'elles produisent. La **Figure 15** présente les concentrations (g/L) en acides gras à courte chaîne produits en fonction des différentes espèces étudiées.



*Figure 15 : Détermination par HPLC de la concentration en acides organiques des surnageants de cultures de 24h à 37°C centrifugées à 5000g pendant 10min puis filtrées à l'aide d'une seringue de 0,22mm. modèle de l'appareil : AGILENT 1200, Californie, USA; la phase mobile: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM, flow: 0,5mL/min, colonne: Aminex HPX-87H, température de la colonne: 50°C, température de la colonne RID: 45°C, volume d'injection: 15µL, temps: 35min)*

Les résultats montrent que l'acide succinique est produit par seulement deux souches et en grande partie par *Leuconostoc mesenteroides* avec une concentration d'environ 7g/L. L'acide lactique et l'acide acétique sont majoritairement produits par *Lactobacillus plantarum* avec respectivement 14g/L et 8g/L. *Leuconostoc pseudomesenteroides* est la deuxième bactérie qui produit plus d'acide lactique et la seule qui produit environ 5g/L d'acide butyrique. *Enterococcus durans* n'a pas produit d'acide acétique contrairement aux 4 autres bactéries. *Leuconostoc pseudomesenteroides* est la seule souche qui produit l'acide butyrique selon les résultats de cette étude. L'acide succinique uniquement produite par *Lactobacillus casei* et de *Leuconostoc mesenteroides* et une très faible quantité d'acide formique (moins de 0,5g/L).

### 3.1.8 Étude du potentiel probiotique des souches d'intérêt

Les tests de performance probiotique sont quant à eux réalisés sur cinq (5) souches parmi celles qui ont donné des résultats satisfaisants lors de l'identification (onze sur vingt et un). Ces 5 souches sont issues de trois produits fermentés (lait fermenté, levain avec du lactosérum et fromage frais de chèvre). Ces souches sont principalement des bactéries lactiques car elles figurent parmi les probiotiques les plus abondants. A chaque souche est attribué un code qui tient compte de l'origine de la matrice (les deux premières lettres du pays) ; la matrice elle-même (les deux premières lettres de l'échantillon) ; le milieu d'isolement (trois caractères) et le numéro de la colonie sélectionnée avec éventuellement les répétitions (**Annexe 2**).

#### 3.1.8.1 Tolérance à l'acidité et aux sels biliaires

La capacité des souches à croître dans des conditions extrêmes de pH initiaux (2,5 ; 6,5) et de sels biliaires (1%) est mise en œuvre dans un bouillon MRS par la mesure de leur densité optique au cours du temps (24h). La croissance des deux souches du genre *Leuconostoc* est

fortement ralentie avec une phase exponentielle qui débute plus tard vers 14h pour *Leuconostoc mesenteroides* et vers 10h pour *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *Enterococcus durans* présente une phase exponentielle qui s'achève plus vite (de 2h à 6h) comme le montre la **Figure 16A**. Cependant, cette souche est la seule à présenter un comportement de croissance lorsque les conditions du milieu deviennent plus extrêmes (pH 2,5 et 1% de sels biliaries) d'après la **Figure 16B**. *Lactobacillus casei* montrent une forte croissance.

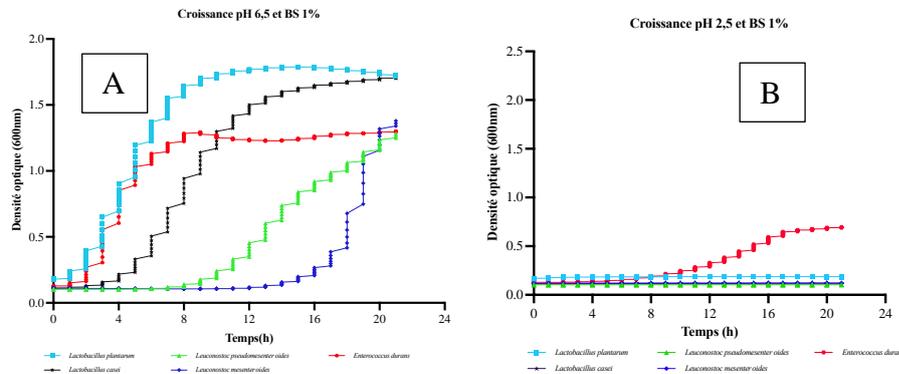


Figure 16 : Évolution de la densité optique à 600nm en fonction du temps de cinq souches dans deux différentes conditions de croissance bouillon MRS ; anaérobie 37°C ; (A) : pH6,5 BS1% et (B) : pH2,5 BS1%. Les courbes sont obtenues sur la base des valeurs moyennes à DO<sub>600nm</sub> en trois répétitions dans chaque condition de culture

### 3.1.8.2 Adhésion aux solvant et autoagrégation

Dans l'optique d'estimer la capacité d'adhésion des souches identifiées, la méthode MATS (Microbial Adhesion To Solvent) a été employée en utilisant le toluène comme solvant. Celui-ci est mis en contact avec les cellules bactériennes lavées deux fois avec du PBS. Les résultats obtenus à partir des mesures de l'absorbance à 600nm des cellules suspendues dans du PBS, montrent que chaque souche a un pourcentage d'hydrophobicité qui est différent. *Enterococcus durans* et *Lactobacillus plantarum* présentent les plus grandes valeurs d'hydrophobicité avec respectivement 36,8 et 39,2% (**Figure 17B**). Dans cette analyse, *Leuconostoc mesenteroides* n'a pas été utilisé car sa croissance devenait quasi impossible.

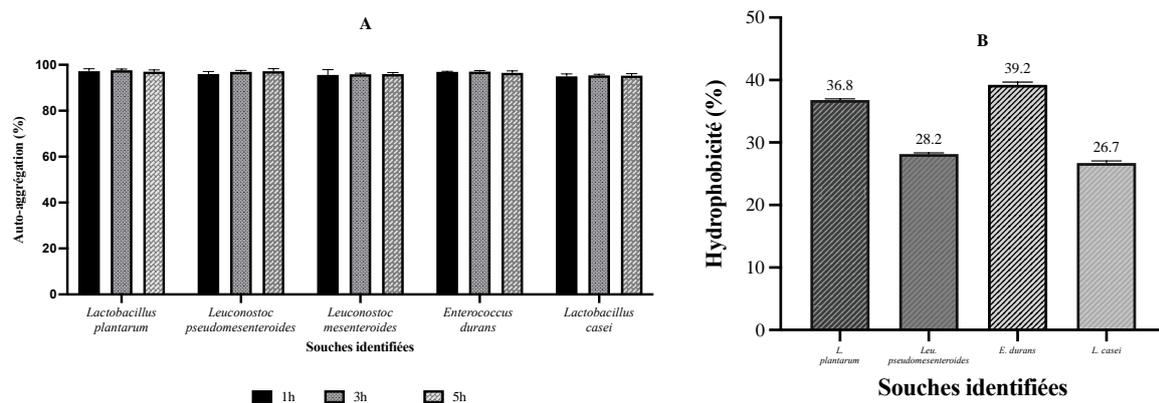


Figure 17 : Mesure de l'autoagrégation à partir des surnageants de culture en fonction du temps (A) et de l'hydrophobicité des cellule lavées au PBS (pH 7) mise en contact avec un solvant hydrophobe (Toluène 99% de pureté) (B)

L'autoagrégation est également investiguée sur les 5 souches. Globalement, les souches présentent des valeurs moyennes qui sont supérieures à 95% avec de très faible écart-types

(Figure 17A). Les résultats de l'anova montrent effectivement que les différences ne sont pas significatives avec une p-value de 0,337 qui est largement supérieure 0,05.

Tableau 12 : Tableau d'analyse de la variance de l'autoagrégation (A) de souches et de leur hydrophobicité (B)

| ANOVA Hydrophobicité          | SS     | DF | MS     | F (DFn, DFd)     | P value |
|-------------------------------|--------|----|--------|------------------|---------|
| Traitement (entre colonnes)   | 1158   | 4  | 289,6  | F (4, 10) = 4003 | P<0,001 |
| Residue (dans chaque colonne) | 0,7234 | 10 | 0,0724 |                  |         |
| Total                         | 1159   | 14 |        |                  |         |
| ANOVA Auto agrégation         | SS     | DF | MS     | F (DFn, DFd)     | P value |
| Traitement (entre colonnes)   | 2,712  | 2  | 1,356  | F (2, 15)= 1,170 | P=0,330 |
| Residue (dans chaque colonne) | 17,38  | 15 | 1,159  |                  |         |
| Total                         | 20,09  | 17 |        |                  |         |

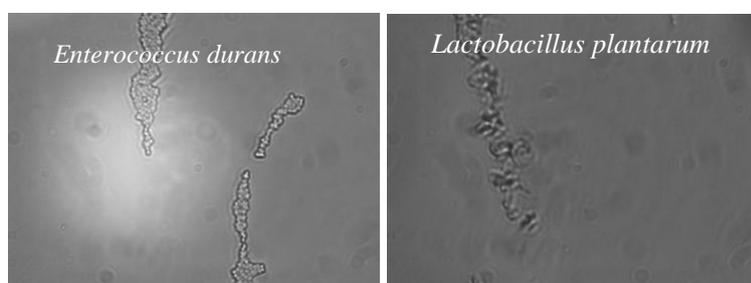


Figure 18 : Aspect microscopique de la formation d'agrégats des cellules bactériennes lavées et laissées séjournées 5h dans du tampon PBS

### 3.1.8.3 Indice d'émulsion

La capacité de nos isolats à produire des substances capables de former des émulsions a été mise en évidence à travers les surnageants des cultures de 18h pour chacune des bactéries retenues. Ces surnageants sont vigoureusement agités avec du toluène puis la hauteur d'émulsion est mesurée après quelques minutes (Figure 19A) puis après 24h (Figure 19B) afin de déterminer l'indice d'émulsion de chaque souche à deux périodes ( $t \sim 0$  et  $t = 24h$ ) (Figure 20). D'une manière générale, l'indice d'émulsion diminue considérablement après 24h. La souche de *Leuconostoc mesenteroides* présente un indice d'émulsion quasiment inchangé et donc une émulsion stable après 24h. On note une réduction considérable de l'émulsion du surnageant de culture des souches de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* et *Enterococcus durans* après 24h.



Figure 19 : Aspect macroscopique du test d'émulsion entre à  $t=0h$  (A) et à  $t=24h$  (B) des surnageants de culture de cinq (5) souches d'intérêt isolées mise en contact avec un composé hydrophobe (toluène)

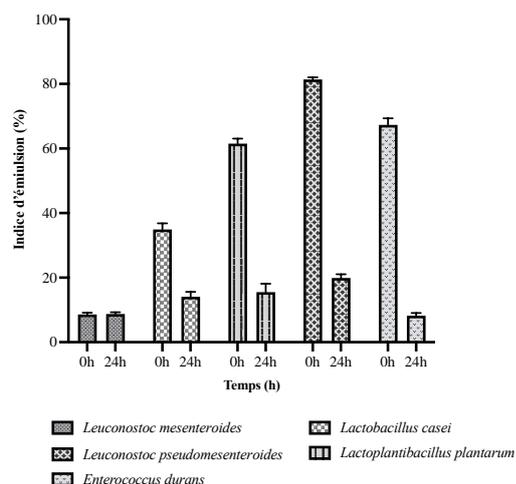


Figure 20 : Indice d'émulsion des surnageants de cultures de cinq souches avec du toluène (v/v). Cet indice est obtenu par la mesure de hauteur d'émulsion formée à 0h et après 24h

### 3.1.9 Propriété de biosécurité : sensibilité aux antibiotiques

#### 3.1.9.1 Antibiogramme

La sensibilité aux antibiotiques fait partir des critères d'innocuité les plus importants dans la sélection des souches probiotiques <sup>131</sup>. Dans cette étude, chaque souche est testée vis-à-vis six (6) différents antibiotiques que sont : l'érythromycine, le chloramphénicol, la tétracycline, la pénicilline, la kanamycine et la streptomycine. Les diamètres (mm) d'inhibition sont notés dans le **Tableau 13**. La zone d'inhibition montrée par les halos claires autour des antibiotiques testés est présentée à la **Figure 21**. On voit clairement que la majorité des bactéries utilisées sont sensibles aux antibiotiques utilisés. Cependant, aucun halo d'inhibition n'est observé pour *Leuconostoc pseudomesenteroides* (E18) alors que *Enterococcus durans* (E21) présente une résistance à la tétracycline et à la streptomycine. *Leuconostoc mesenteroides* n'a cependant, pas été utilisé car ne présentait pas de croissance.

Tableau 13 : Antibiogramme réalisé avec six (6) antibiotiques différents contre les cinq (5) potentiels probiotiques

| Souches | ATB et diamètre d'inhibition (mm) |          |          |          |          |          |
|---------|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|         | ERY 15µg                          | CLR 30µg | TET 30µg | PEN 10µg | KAN 30µg | STR 10µg |
| E17     | 32                                | 25       | 11       | -        | 11       | 11       |
| E18     | -                                 | -        | -        | -        | -        | -        |
| E21     | 25                                | 16       | -        | 23       | 19       | -        |
| E22     | 32                                | 33       | 34       | 19       | 28       | 22       |

E17: *Lactobacillus plantarum* ; E18: *Leuconostoc pseudomesenteroides* ; E21: *Enterococcus durans* ; E22: *Lactobacillus casei*

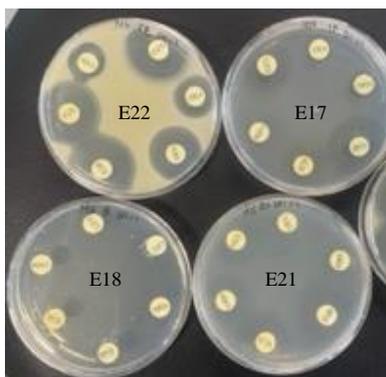


Figure 21 : Zones d'inhibition de six antibiotiques testés contre les souches isolées

### 3.1.9.2 Test d'antagonisme

Ce test est réalisé sur du MRS gélosé. Deux souches (E17 et E19) sur cinq sont antagonistes vis-à-vis de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus epidermidis* alors que quatre (E17, E19, E21 et E22) sur cinq sont capables d'inhiber *E. coli* (**Figure 22**). Les diamètres des zones d'inhibition sont exprimés en mm dans le **Tableau 14**.

L'activité antimicrobienne ( $x$ ) a été calculée comme suit :  $x = D - d$ , où  $D$  représente le diamètre de la zone d'inhibition et  $d$  le diamètre du disque. L'activité antimicrobienne ( $x$ ) a été caractérisée et classée en fonction des diamètres de la zone d'inhibition et décrite comme légère ( $x < 4\text{mm}$ ), moyenne ( $x = 4-8 \text{ mm}$ ), élevée ( $x = 8-12 \text{ mm}$ ) et très élevée ( $x > 12\text{mm}$ )<sup>132</sup>.

La plupart des isolats testés ont montré des zones d'inhibition importantes, mettant en évidence leur fort pouvoir inhibiteur. Les bactéries notées 22 (E22) et 21 (E21) présentent une zone d'inhibition de faible diamètre sur les trois pathogènes. La souche E18 ne présente aucune inhibition quel que soit le pathogène considéré tandis que la souche E17 présente un diamètre très élevé pour les trois pathogènes testés.

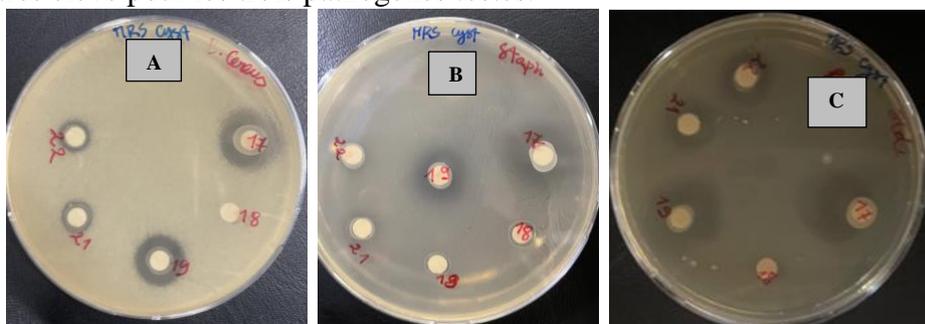


Figure 22 : Activité antimicrobienne des cinq (5) souches identifiées vis-à-vis des souches indicatrices *Bacillus cereus* (A), *Staphylococcus epidermidis* (B) et *E. coli* (C) inoculées à la surface d'une gélose MRS

Tableau 14 : Mesure des diamètres d'inhibition des isolats exprimés en mm matérialisé par les signes : +(inhibition) et – pour (pas d'inhibition)

| Souches probiotiques                   | <i>E. coli</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
|--|----------------|------------------------|-----------------------------------|
| <i>Lactobacillus plantarum</i>         | 15mm           | 19mm                   | 19mm                              |
| <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> | 0mm            | 0mm                    | 8mm                               |

|                                  |      |       |      |
|----------------------------------|------|-------|------|
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | 21mm | 15 mm | 17mm |
| <i>Enterococcus durans</i>       | 15mm | 10mm  | 9mm  |
| <i>Lactobacillus casei</i>       | 16mm | 9mm   | 10mm |

### 3.2 Discussion

Actuellement, les antibiotiques continuent d'être utilisés en élevages et en aquaculture malgré l'apparition des phénomènes de résistance<sup>133</sup>. En réponse à cette problématique, les probiotiques apparaissent comme une solution plus satisfaisante. Ces microorganismes peuvent maintenir l'équilibre de la flore intestinale, inhiber la prolifération des agents pathogènes dans l'intestin et prévenir l'inflammation<sup>134</sup>. Elles sont d'origine alimentaire ou non<sup>135</sup>.

Ce présent travail vise à étudier le potentiel probiotique des bactéries isolées et identifiées de divers produits biologiques fermentés. Plusieurs tests ont été réalisés pour observer les caractéristiques probiotiques de nos souches. Il s'agit entre autres de l'inhibition de pathogènes, la sensibilité aux antibiotiques, les propriétés d'adhésion, la résistance aux conditions gastrointestinales et la production d'acides organiques.

L'ensemble des isolats ont été identifiés par la technique de MALDI-ToF/MS et de l'ADN 16S avant de réaliser l'ensemble des tests de performance évoqués ci-dessus.

Pour le MALDI-ToF, l'identification est principalement basée sur l'identification des protéines ribosomales très abondantes dans tous les microorganismes. Les motifs caractéristiques de ces protéines sont comparés à ceux stockés dans une grande base de données, afin de déterminer l'identité du microorganisme jusqu'au niveau de l'espèce<sup>116</sup>. Un score supérieur à 2 ou compris entre 2 et 3 indique une bonne fiabilité et une forte probabilité de l'identification de l'espèce (**Tableau 9**)<sup>136</sup>. A l'exception d'une seule souche dont le score d'identification est de 1,7, le reste des souches présentent un score compris en 2,02 et 2,37. Ces mêmes scores ont aussi été considérés dans l'identification des bactéries lactiques isolées à partir de poissons<sup>106,137,138</sup>. Bien que des cultures sur gélose et liquide ont été utilisées, aucune différence n'a été observée au niveau des résultats de l'identification des espèces microbiennes. Cela a également été rapporté par un groupe recherche montrant que les conditions de culture ne peuvent affecter que la physiologie microbienne et le profil d'expression des protéines et non l'identification microbienne par MALDI-ToF MS<sup>139</sup>. Une autre équipe de recherche a aussi signalé que les conditions de culture et le temps de culture n'avaient pas d'incidence sur l'identification microbienne par cette même technique<sup>140</sup>. Cette technique protéomique permet l'identification bactérienne en quelques minutes avec une grande précision par rapport à l'analyse génétique de routine. En effet, l'identification par le séquençage de l'ADN 16S nécessite en plus de la culture, l'extraction et la purification de l'ADN avant séquençage et ensuite comparaison des résultats obtenus avec des bases de données en ligne. Globalement le processus est donc plus long que l'analyse par spectrométrie de masse. Néanmoins, les scores obtenus étaient suffisants pour une identification fiable et identique à celle obtenue par MALDI-ToF MS. L'identification par MALDI-ToF MS présente toutefois des limites. En effet, l'identification de nouveaux isolats n'est possible que si la base de données spectrales contient des empreintes digitales de masse peptidique des souches types de genres/espèces/sous-espèces/souches spécifiques<sup>105</sup>.

Cette stratégie de confrontation de ces deux méthodes a également été mise en œuvre avec succès par les travaux de **Lawton et al., (2018)** pour la détermination du genre bactérien de souches isolées des oiseaux sauvages et des poulets. Cependant, leurs résultats au niveau de l'assignement de l'espèce étaient significativement différents. Les principaux problèmes rencontrés avec le MALDI-Tof MS sont liés aux scores qui sont quelque peu limités lorsqu'il s'agit d'identifier et de différencier des souches et des espèces étroitement apparentées<sup>141</sup>.

La fermentation qui est un processus biologique généralement rencontré dans les aliments, est le résultat de l'activité de différentes souches microbiennes. Parmi ces microorganismes on retrouve ceux qui ont un effet bénéfique sur l'hôte. Ils sont appelés « probiotiques » lorsqu'ils obéissent aux critères définis par la FAO. Parmi ces probiotiques l'on retrouve les bactéries lactiques<sup>142,8</sup> qui font l'objet de notre étude. En effet, les aliments fermentés utilisés dans notre cas ont révélé la présence de souches potentiellement probiotiques notamment *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus durans*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc pseudomesenteroides* comme le rapportent plusieurs études<sup>143,144</sup>.

L'inhibition des germes pathogènes constitue une propriété essentielle recherchée chez les probiotiques<sup>145,146</sup>. Parmi les souches appartenant au groupe lactique testées quatre (*Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus durans* et *Lactobacillus casei*) ont montré une zone d'inhibition avec des diamètres variant entre 9 et 21 mm autour des pathogènes *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis* et *Bacillus cereus*. La souche E21 (*Enterococcus durans*) présente une inhibition contre *E. coli*, *B. cereus* et *S. epidermidis* avec respectivement 15 mm, 10 mm et 9 mm. Ces résultats sont supérieurs à ceux de **Pieniz et al., (2014)** qui ont montré qu'une souche de *Enterococcus durans* LAB18s inhibe les mêmes microorganismes indicateurs avec respectivement de 7,2 mm ; 7,5 mm et 9,1 mm de diamètres<sup>149</sup>. Ces différences pourraient résider dans le choix des souches bactériennes étudiées. La souche E22 (*Lactobacillus casei*) inhibe le pathogène *E. coli* avec 16 mm de diamètre d'inhibition contre 8 mm trouvé par **Turgay et al., 2006**. La différence de résultats obtenus s'explique par la méthode employée pour réaliser ce test. En effet, l'activité inhibitrice mise en évidence par ces auteurs, est basée sur l'utilisation des surnageants de culture alors que dans notre cas, il s'agit d'une culture neuve de *Lactobacillus casei* dans un bouillon MRS. Le pouvoir antagoniste semble être courant chez les bactéries lactiques issues des produits fermentés<sup>132</sup>. Les valeurs de diamètres d'inhibition trouvées dans notre étude, se situent pratiquement dans le même intervalle que ceux trouvés par de récentes études sur le pouvoir inhibiteur des souches de bactéries lactiques isolées d'une espèce de crustacé vivant (*Artemia sp*)<sup>131</sup>. Cependant, les auteurs de cette étude ont plutôt utilisé le surnageant de culture de ces bactéries lactiques pour atteindre ces valeurs (2 à 27 mm) d'inhibition contre les pathogènes. Cet effet d'antagonisme est peut-être la conséquence de la production de bactériocines, mais aussi d'autres facteurs d'inhibitions, tels que la production d'acides organiques et de peroxyde d'hydrogène<sup>147,148</sup>. En effet, une autre étude utilisant les plantaricine K25, LD4 et 149, des bactériocines produites par différentes souches de *L. plantarum* isolées d'aliments fermentés ont exercé une forte activité inhibitrice respectivement par la dégradation de la surface membranaire de *Bacillus cereus*<sup>149</sup>, des perforations au niveau de la membrane des cellules de *E. coli*<sup>144</sup> et par interaction avec les membranes des bactéries gram+ notamment le genre

*Staphylococcus*<sup>150</sup>. Partant de ces résultats, nous pouvons considérer que nos souches inhibitrices sont des candidats probiotiques potentiels.

Dans la continuité de la caractérisation de nos souches potentiellement probiotiques, des tests de sensibilité aux antibiotiques sont effectués. Les diamètres des zones d'inhibition, mesurés ont permis définir pour chaque antibiotique testé les souches résistantes et celles sensibles. Selon le comité antibiotique de la Société Française de Microbiologie<sup>124</sup> une bactérie est résistante à un antibiotique si le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 8 mm, intermédiaire si le diamètre est compris entre 8 et 22 mm. Au-delà de 22 mm, la bactérie est considérée comme sensible à l'antibiotique<sup>14</sup>. Sur la base de ce critère, la souche E17 (*Lactobacillus plantarum*) est totalement sensible à l'érythromycine (macrolides) et au chloramphénicol tandis qu'elle résiste à la streptomycine. Cette résistance à la streptomycine peut être conférée par les gènes intrinsèques de résistance aux aminosides (aac(6')-aph(2''), ant(6) et aph(3')-IIIa)<sup>151</sup>. Ces résultats sont en adéquation avec ceux de **Wong et al., 2015** qui ont montré qu'avec un diamètre > 5mm, des suppléments alimentaires principalement des souches de bactéries lactiques, étaient sensibles à l'érythromycine et à la streptomycine<sup>151</sup>. Cependant, la souche E18 (*Leuconostoc pseudomesenteroides*) présente une résistance totale à tous les ATB testés. Des résultats contradictoires ont été trouvés par **Wang et al., 2018**. En effet, selon leurs résultats de l'antibiogramme, cette souche était sensible à l'Amoxicilline, à l'Erythromycine et à la Tétracycline<sup>152</sup>. Cette souche serait donc inexploitable en tant que probiotique selon les critères définis par la FAO<sup>100</sup>. Quant à la souche E22 (*Lactobacillus casei*), elle présente une sensibilité presque totale à la pénicilline contrairement à ce qui est trouvé par **Turgay et al., 2006**. En effet, selon leurs résultats, *Lactobacillus casei* présentait une résistance totale à tous les antibiotiques trouvés, notamment à l'Oxacilline (une pénicilline du groupe M, l'Ampicilline (une pénicilline du groupe A) et à la Tobramycine (aminoside). Cette différence surtout au niveau des groupes de pénicilline pourrait s'expliquer par les concentrations d'antibiotiques utilisées<sup>153</sup>. En effet, ces chercheurs ont utilisé 1µg d'Oxacilline, une concentration dix fois inférieure à la nôtre (10µg).

La majorité des activités antimicrobiennes des souches probiotiques est associée à leur aptitude à produire et à libérer dans leur environnement<sup>154</sup>, des acides organiques notamment des acides gras à courte chaîne (acide lactique, acide acétique, acide citrique, acide malique, acide oxalique, acide succinique, acide butyrique, acide propionique, acide valérique)<sup>132</sup>. Au regard de l'importance de ces composés, notre étude a pu identifier avec succès quelques-uns, produits par les souches isolées. On constate que *Lactobacillus plantarum* est la souche qui produit la plus grande quantité d'acide lactique et d'acide acétique comme le démontrent les résultats de **Nathan et al., 2021 et de Saelim et al., (2017)**<sup>147,155</sup>. Ceux-ci suggèrent que ces composés organiques sont impliqués dans les activités antagonistes observées précédemment. Ces résultats coïncident avec ceux de **Tajero et al., 2012**, qui ont observé des effets des substances antimicrobiennes issues des surnageants de culture à pH 7<sup>147</sup>.

D'après les résultats de la **Figure 14**, la diminution du pH est fonction de la souche. La plupart des souches de bactéries lactiques étudiées ici présentent une diminution du pH signe de l'augmentation du taux d'acidité qui est un indicateur de la production d'acide organique.

La tolérance aux conditions gastrointestinales, en l'occurrence l'acidité et la présence de sels biliaires, a permis de mettre en évidence une propriété indispensable dans la caractérisation des souches probiotiques<sup>111</sup>. Les résultats montrent que dans un milieu à pH acide (2,5) supplémenté de 1% de sels biliaires, *Enterococcus durans* est capable de croître avec une augmentation légère de la DO qui passe de 0,1 à environ 0,5. Ces résultats corroborent avec ceux de **C.M Franz et al., (2001)** qui ont montré que cette souche isolée d'un produit alimentaire possède des enzymes capables d'hydrolyser de 44% les sels biliaires<sup>156</sup>. Les autres souches de bactéries lactiques quant à elles ne présente aucun signe de croissance selon la mesure de la densité optique. Leur croissance a peut-être été inhibé par le milieu trop acide (pH 2,5). Le traitement à l'acide influence fortement la croissance de certains probiotiques comme l'ont montré les travaux de certains auteurs qui n'ont observé aucune croissance de ces souches de bactéries lactiques sur de la gélose MRS après un traitement à l'acide et à la bile de bœuf. Des résultats qualitatifs ont également confirmé qu'après une culture en bouillon MRS (pH 6,5 et 1% SB ; pH 2,5 et 1% SB) puis un étalement sur gélose, *Enterococcus durans* est la seule souche à présenter des colonies sur la gélose MH après 24h d'incubation. Cela montre clairement que toutes les souches n'ont pas la capacité de résister à de telles conditions. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par **Pieniz et al., (2014)** qui ont observé une stabilité d'une souche d'*Enterococcus durans* précisément *E. durans* LAB18s dans un milieu similaire au conditions intestinale à pH 3 en présence de 1% de SB.

L'hydrophobicité des souches isolées est utilisée pour prédire la capacité d'adhésion bactérienne à un substrat hydrophobe (le toluène). Les résultats montrent que les souches d'*Enterococcus durans* et *Lactobacillus plantarum* affichent une plus grande affinité pour le toluène avec respectivement 39,5 et 36,7% d'hydrophobicité. Ces valeurs indiquent la nature hydrophobe de la surface externe de cellules bactérienne étudiées qui est très souvent impliquée dans les interactions avec les pathogènes. La différence d'hydrophobicité est hautement significative avec une p-value<0,001. Cependant, ces pourcentages d'hydrophobicité sont largement inférieurs à ceux trouvés par **Wouters et al., (2015)** qui ont obtenu au moins 80% d'hydrophobicité pour les souches de *Lactobacillus étudiées*<sup>130</sup>.

L'autoagrégation est une autre façon indirecte de mesurer l'adhésion bactérienne. Cette mesure a été effectuée à différents intervalles de temps et montre que nos souches ont une grande capacité d'autoagrégation avec au moins 85% au bout de 5h d'incubation. **Adesokan et al., (2021)** ont aussi montré que les souches de probiotiques isolées présentaient une autoagrégation de plus de 95% après 20h d'incubation<sup>157</sup>.

Les propriétés émulsifiantes des souches sont testées en agitant vigoureusement les surnageant de culture avec du toluène (v/v). Ce paramètre est évalué en déterminant l'indice d'émulsion pour chaque bactérie à différentes périodes. Cet indice renseigne sur la capacité et la stabilité des émulsions formées. On constate que l'indice d'émulsion diminue fortement dans chaque cas après 24h sauf pour *Leuconostoc mesenteroides* dont les valeurs restent presque identiques (9%) après 24h. Ces résultats indiquent la capacité de cette souche à produire de composés stabilisant une émulsion mais ne formant pas plus d'émulsion que ceux de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Ces propriétés tant en capacité qu'en stabilité émulsionnante seraient la conséquence de la présence de biomolécules à activité

interfaciale (ex. : biosurfactants) dans le surnageant de culture des différentes souches caractérisées.

## Conclusion et perspectives

A l'issue de cette étude, il convient de retenir que plusieurs souches ont été identifiées par Maldi-ToF-MS et le séquençage de l'ADN 16S. L'obtention des résultats concordant permet d'attester de la fiabilité de ces techniques. Cependant, des limites ont été observées chez chacune des méthodes notamment, une durée plus longue pour la méthode de séquençage de l'ADN 16S et l'identification de nouvelles souches microbiennes ne figurant pas dans une base de données, compromet la pertinence de la méthode protéomique (Maldi-TOF MS). Cinq souches ont été isolées de quelques produits fermentés des pays du sud et utilisées pour évaluer les potentialités probiotiques qu'elles disposent. Elles ont effectivement présenté des propriétés intéressantes telles que la résistance aux conditions gastrointestinales, le pouvoir antagoniste, l'inhibition d'agents pathogènes comme *Bacillus cereus*, *E. coli* et *Staphylococcus epidermidis*, la production de l'acide organiques et la capacité d'adhésion. *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc pseudomesenteroides* sont des souches effectivement différentes, au regard de leur propriété à former une émulsion stable, leur caractère hydrophobe, leur spectre d'action contre les pathogènes testés. Les tests de biosécurité se sont avérés rassurants où la majorité des souches étaient sensibles à une large gamme d'antibiotiques. L'étude de ces souches mérite d'être approfondie afin de mieux appréhender l'effet bénéfique observé chez chacune et d'effectuer des applications *in vivo* particulièrement en agriculture car il prévaut encore des doutes sur le caractère probiotique de certaines souches comme *Enterococcus durans* malgré toutes ses propriétés intéressantes observées.

Pour consolider ces résultats et mieux appréhender l'effet bénéfique observé chez les souches retenues, il convient d'effectuer des applications *in vivo* sur les animaux d'élevage.

La détermination précise des mécanismes d'action par lesquels ces bactéries ou leurs métabolites contribuent au renforcement de l'immunité de l'hôte (homme, animal ou végétal), permettra d'adopter une réponse plus efficace dans les méthodes de sélection.

Les recherches futures sur les probiotiques devraient étudier l'interaction entre des souches bactériennes spécifiques ou développer des méthodes intégrant des prébiotiques dans les milieux de culture afin d'accroître leurs potentialités, leur capacité à résister à des conditions plus hostiles. Il convient également de prendre en compte de l'importante corrélation entre l'hôte, l'alimentation et les microorganismes pour maximiser leur effet probiotique.

## 4 Annexes

### 4.1 Milieu de culture

- **Gélose MRS**

|  |            |
|--|------------|
| Peptone de caséine .....               | 10 g       |
| Extrait de viande .....                | 5 g        |
| Extrait de levure .....                | 5 g        |
| Glucose soluble .....                  | 20 g       |
| Acétate de sodium .....                | 5 g        |
| Tween 80 .....                         | +/- 1,00 g |
| Citrate de tri-ammonium .....          | 2 g        |
| Di-potassium d'hydrogène citrate ..... | 2 g        |
| Sulfate de manganèse .....             | 0,1 g      |
| Sulfate de magnésium .....             | 0,1 g      |
| Agar .....                             | 16 g       |

- **M17**

Pour 1 litre de milieu:

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| Tryptone.....                      | 2,50 g  |
| Peptone pepsique de viande.....    | 2,50 g  |
| Peptone papainique de soja .....   | 5,00 g  |
| Extrait autolytique de levure..... | 2,50 g  |
| Extrait de viande .....            | 5,00 g  |
| Lactose .....                      | 5,00 g  |
| Glycérophosphate de sodium .....   | 19,00 g |
| Sulfate de magnésium .....         | 0,25 g  |
| Acide ascorbique .....             | 0,50 g  |
| Agar agar bactériologique.....     | 15,00 g |

pH 7,2 Stérilisation à 120°C pendant 20m

- **RCM**

Difco™ Reinforced Clostridial Medium

Approximate Formula\* Per Liter

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Peptone .....            | 10.0 g |
| Extrait de viande .....  | 10.0 g |
| Extrait de levure .....  | 3.0 g  |
| Dextrose .....           | 5.0 g  |
| Chlorure de Sodium ..... | 5.0 g  |
| Amidon soluble .....     | 1.0 g  |
| L-Cystéine HCl .....     | 0.5 g  |
| Acétate de Sodium .....  | 3.0 g  |
| Agar .....               | 0.5 g  |

## 4.2 Solution tampon

- Eau peptonné

Chlorure de sodium.....5,00 g  
 Peptone .....1,00 g  
 Tween 80 .....+/- 1,00 g

- Tampon phosphate (PBS)

NaCl.....  
 Peptone de caséine.....  
 Eau distillée.....

*Annexe 1 : Composition de milieu de culture et solutions tampons utilisés*

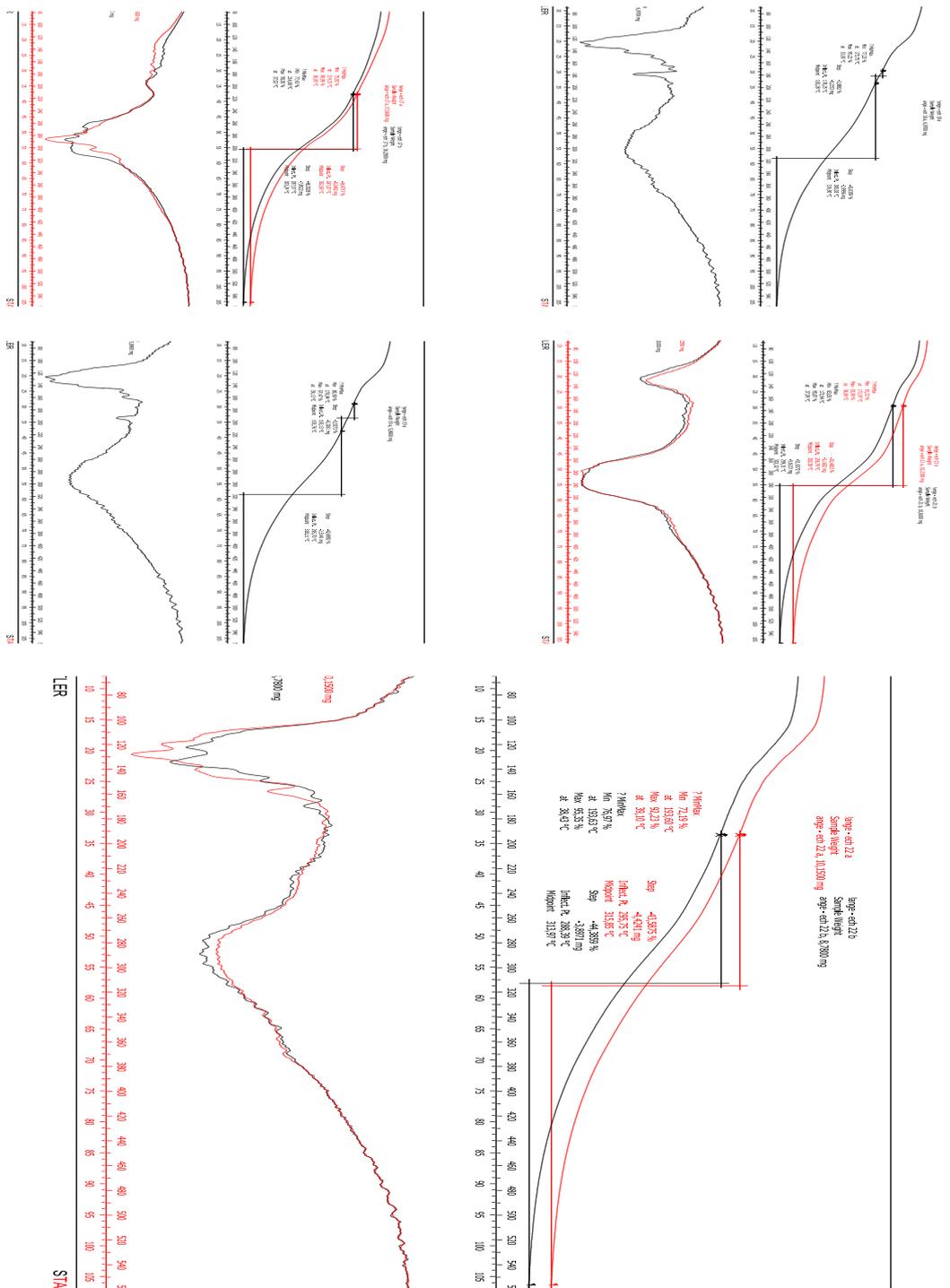
| Numéro de référence | Matrice                  | ID souche | Aspect macroscopique                              |
|---------------------|--------------------------|-----------|---|
| 12                  | Vinaigre de cidre        | VPO1      | arrondi, bordure transparente et centre laiteux   |
| 13                  | Vinaigre de cidre        | VPO2      | grosse colonie jaunâtre laiteux                   |
| 14                  | Olive naturel désamérisé | OLNF1     | informe, transparent et gluant, intérieur liquide |
| 15                  | Olive naturel désamérisé | OLNF2     | informe, transparent et gluant, intérieur liquide |
| 16                  | Lévain                   | LEV (1)1  | arrondi blanchâtre laiteux                        |
| 17                  | Lévain                   | LEV (1)2  | arrondi, petites colonies transparentes           |
| 18                  | fromage frais de chèvre  | CHE (1)1  | petites colonies arrondis et laiteux              |
| 19                  | fromage frais de chèvre  | CHE2      | petites colonies arrondis et laiteux              |
| 20                  | Fromage frais de vache   | VAC (4)1  | arrondi blanchâtre laiteux                        |
| 21                  | Lait fermenté            | LAI (1)2  | laiteux transparent                               |
| 22                  | Lait fermenté            | LAI (2)1  | arrondi, petites colonies transparentes           |
| 23                  | Olive naturel désamérisé | OLIV (1)1 | légèrement jaunâtre et laiteux                    |
| 24                  | fromage frais de chèvre  | CHE3      |   |
| 25                  | Ensilage                 | SN2B (7)  |   |
| 26                  | Ensilage                 | SN5B (1)  |   |
|                     | Lait fermenté            | MN4A(4)   |   |
|                     | Lait fermenté            | MpH5B     |   |
|                     | Olive naturel désamérisé | ONA4A (1) |   |

|  |                          |           |  |
|--|--------------------------|-----------|--|
|  | Olive naturel désamérisé | OpH2B (1) |  |
|--|--------------------------|-----------|--|

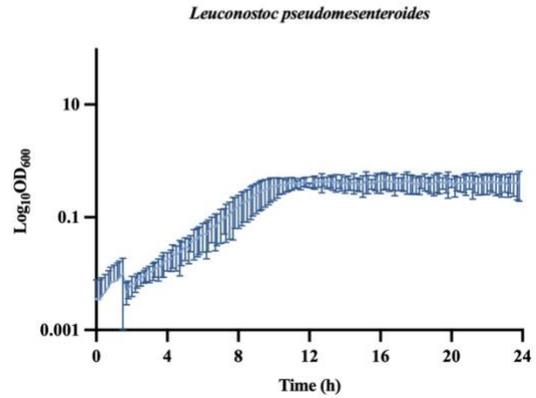
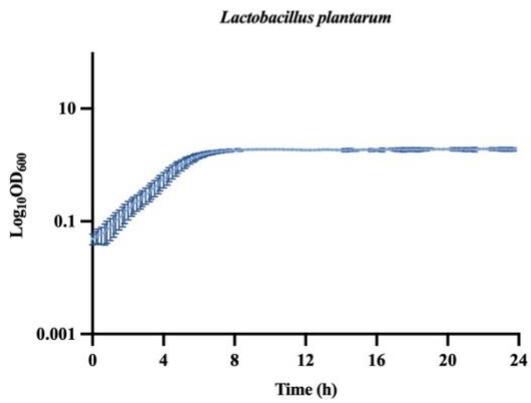
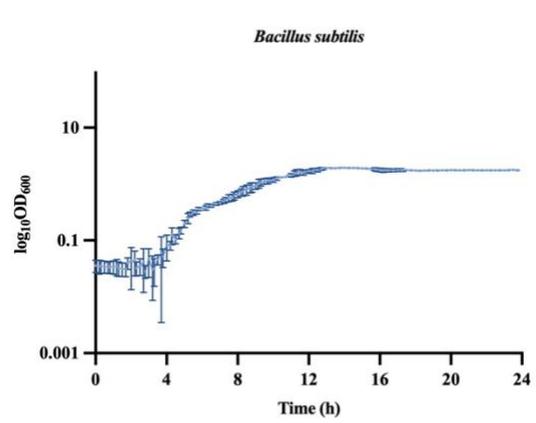
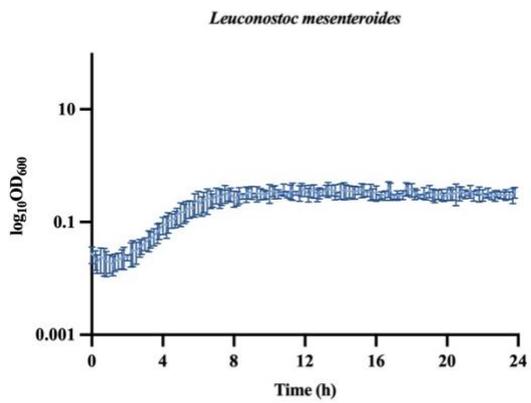
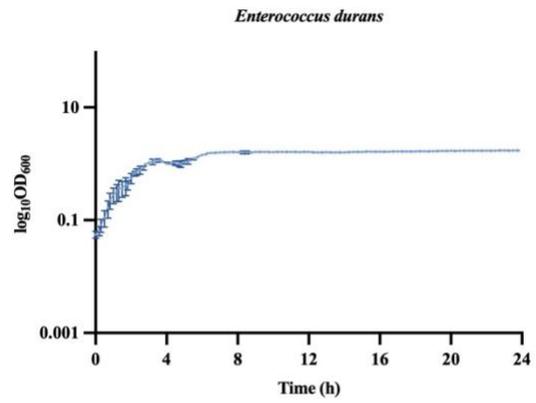
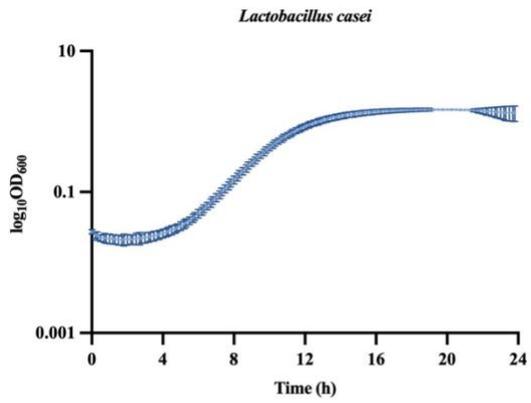
Annexe 2 : Liste de quelques colonies isolées des différentes matrices utilisées dans cette étude

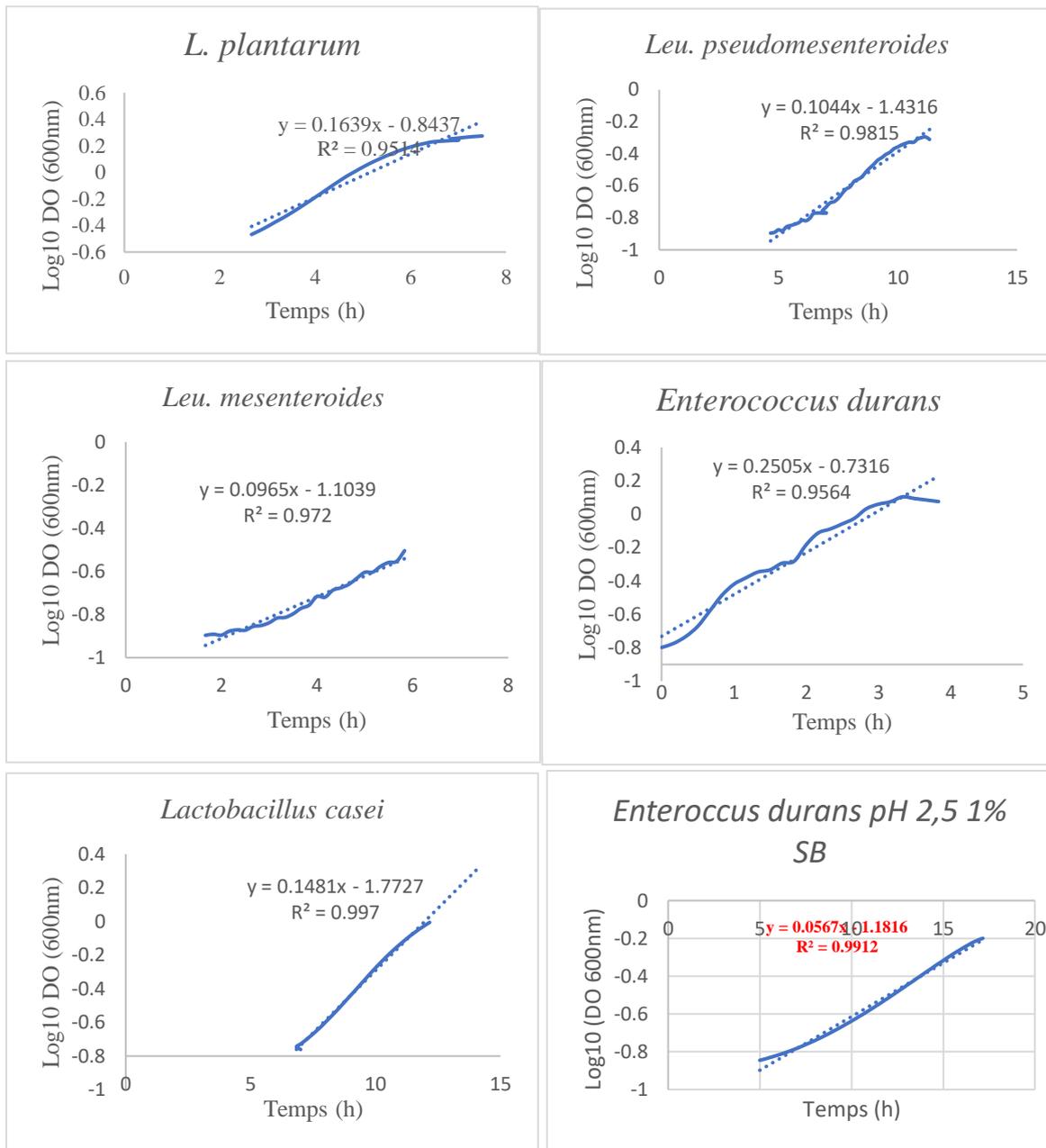
| ID souche   | ADN16S                                     | Query cover | MALDI-TOF 1                            | Score |
|-------------|--|-------------|--|-------|
| MAPOMRS 2   | <i>Bacillus thuringensis</i>               | 98,05%      | <i>Bifidobacterium animalis</i>        | 2,05  |
| MAOL MRS 1  | <i>Bacillus paralicheniformis</i>          | 96,93%      | <i>Bacillus licheniformis</i>          | 2,09  |
| MAOL MRS 2  | <i>Bacillus sp/ licheniformis</i>          | 100,00%     | <i>Lysinibacillus boronitolerans</i>   | 1,95  |
| MALEMRS 1_1 | <i>Lactopantibacillus pentosus</i>         | 98,02%      | <i>Lactobacillus plantarum</i>         | 1,92  |
| MALEMRS 1_2 | <i>Lactobacillus plantarum</i>             | 99,38%      | <i>Lactobacillus plantarum</i>         | 2,32  |
| MACHMRS 1_1 | <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>     | 100%        | <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> | 2,2   |
| MACHMRS 2   | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>           | 99,65,62%   | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>       | 2,42  |
| MALAMRS 1_2 | <i>Enterococcus durans</i>                 | 100%        | <i>Enterococcus durans</i>             | 2,28  |
| MALAMRS 2_1 | <i>Lactobacillus casei</i>                 | 100%        | <i>Lactobacillus casei</i>             | 2,37  |
| MAENMRS 7   | <i>Bacillus sp</i>                         | 99,69%      | <i>Bacillus sp</i>                     | 2,4   |
| MAENMRS 1   | <i>Bacillus sp</i>                         | 100%        | <i>Bacillus sp</i>                     | 2,35  |
| MALAM17 1_1 | <i>Enterococcus faecalis</i>               | 99%         | <i>Enterococcus faecalis</i>           | 2,27  |
| MALAM17 1_2 | X  |             | <i>Enterococcus italicus</i>           | 2,15  |
| MALAM17 2_1 | <i>Enterococcus faecalis</i>               | 96%         | <i>Enterococcus faecalis</i>           | 2,23  |
| MALAM17 2_2 | <i>Enterococcus faecalis</i>               | 100%        | <i>Enterococcus faecalis</i>           | 2,27  |
| MALAM17 3_1 | <i>Lactobacillus paracasei</i>             | 100%        | <i>Lactobacillus paracasei</i>         | 2,27  |
| MALAM17 3_2 | <i>Lactobacillus paracasei</i>             | 100%        | <i>Lactobacillus paracasei</i>         | 2,21  |
| MAOLM17 1_2 | <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>        | 100%        | <i>Micrococcus luteus</i>              | 2,19  |
| MAVAM17 1_2 | <i>Enterococcus faecalis (seq pas top)</i> | 100%        | <i>Kluyveromyces lactis</i>            | 2,09  |
| MAVAM17 2_2 | X  |             | <i>Kluyveromyces lactis</i>            | 2,16  |
| MACHM17 1   | <i>Bacillus thuringiensis</i>              | 100%        | <i>Lysinibacillus sphaericus</i>       | 2,11  |

Annexe 3: Liste des 21 souches identifiées par séquençage de l'ADN 16S et spectrométrie MALDI-ToF



Annexe 4 : Résultats de l'analyse thermogravimétrique des cinq souches bactériennes sélectionnées sous la forme lyophilisée. L'analyse réalisée à l'aide du TGA/DSC 1 star system de chez Mettler Toledo avec une gamme de température compris entre 25 et 600°C pendant 2h





## 5 Références bibliographiques

- (1) Anderson, A. J.; Kim, Y. C. Biopesticides Produced by Plant-Probiotic *Pseudomonas Chlororaphis* Isolates. *Crop Prot.* **2018**, *105*, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.11.009>.
- (2) Baldwin\*, C.; Millette\*, M.; Oth †, D.; Ruiz, M. T.; Luquet, F.-M.; Lacroix, M. Probiotic *Lactobacillus Acidophilus* and *L. Casei* Mix Sensitize Colorectal Tumoral Cells to 5-Fluorouracil-Induced Apoptosis. *Nutr. Cancer* **2010**, *62* (3), 371–378. <https://doi.org/10.1080/01635580903407197>.
- (3) Saez-Lara, M. J.; Gomez-Llorrente, C.; Plaza-Diaz, J.; Gil, A. The Role of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Other Related Diseases: A Systematic Review of Randomized Human Clinical Trials. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2015/505878>.
- (4) Mackowiak, P. A. Recycling Metchnikoff: Probiotics, the Intestinal Microbiome and the Quest for Long Life. *Front. Public Health* **2013**, *1*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2013.00052>.
- (5) Kurmann, J. Une nouvelle génération de cultures en industrie laitière: aspects microbiologiques, biotechnologiques et probiotiques des cultures de bactéries composées de souches sélectionnées d'origine intestinale humaine.
- (6) These de Doctorat 111.Pdf.
- (7) Gonzalez, M.; Luis, J. Utilisation de la coculture de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M et *Lactobacillus rhamnosus* R, pour moduler le poids moléculaire de leurs exopolysaccharides produits. 122.
- (8) Shokryazdan, P.; Faseleh Jahromi, M.; Liang, J. B.; Ho, Y. W. Probiotics: From Isolation to Application. *J. Am. Coll. Nutr.* **2017**, *36* (8), 666–676. <https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1337529>.
- (9) Samot, J. Evaluation Du Potentiel Probiotique de Lactobacilles Buccaux. 124.
- (10) Endo, A.; Gueimonde, M. Isolation, Identification and Characterisation of Potential New Probiotics. **2016**, 23.
- (11) Harzallah, D.; Belhadj, H. Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Mucosal Barrier. In *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*; Kongo, J. M., Ed.; InTech, 2013. <https://doi.org/10.5772/50732>.
- (12) Rokka, S.; Rantamäki, P. Protecting Probiotic Bacteria by Microencapsulation: Challenges for Industrial Applications. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *231* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1246-2>.
- (13) Gbassi, G. K.; Vandamme, T.; Yolou, F. S.; Marchioni, E. In Vitro Effects of PH, Bile Salts and Enzymes on the Release and Viability of Encapsulated *Lactobacillus Plantarum* Strains in a Gastrointestinal Tract Model. *Int. Dairy J.* **2011**, *21* (2), 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.09.006>.
- (14) Authority (EFSA), E. F. S. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) Approach for Assessment of Selected Microorganisms Referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee. *EFSA J.* **2007**, *5* (12), 587. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.587>.
- (15) Holzapfel, W. H.; Haberer, P.; Geisen, R.; Björkroth, J.; Schillinger, U. Taxonomy and Important Features of Probiotic Microorganisms in Food and Nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73* (2), 365s–373s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365s>.
- (16) Jagadeesh, K. S. Lactic Acid Bacteria as a Source of Functional Ingredients. *South Indian J. Biol. Sci.* **2015**, *1* (2), 70. <https://doi.org/10.22205/sijbs/2015/v1/i2/100422>.
- (17) Samot, J.; Badet, C. Antibacterial Activity of Probiotic Candidates for Oral Health. *Anaerobe* **2013**, *19*, 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.11.007>.
- (18) Franz, C. M. A. P.; Huch, M.; Abriouel, H.; Holzapfel, W.; Gálvez, A. Enterococci as Probiotics and Their Implications in Food Safety. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *151* (2), 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014>.
- (19) El-Ghaish, S.; Ahmadova, A.; Hadji-Sfaxi, I.; El Mecherfi, K. E.; Bazukyan, I.; Choiset, Y.; Rabesona, H.; Sitohy, M.; Popov, Y. G.; Kuliev, A. A.; Mozzi, F.; Chobert, J.-M.; Haertlé, T. Potential Use of Lactic Acid Bacteria for Reduction of Allergenicity and for Longer

- Conservation of Fermented Foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2011**, 22 (9), 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.05.003>.
- (20) *Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation*; Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Eds.; FAO food and nutrition paper; Food and Agriculture Organization of the United Nations : World Health Organization: Rome, 2006.
- (21) Foligné, B.; Dewulf, J.; Breton, J.; Claisse, O.; Lonvaud-Funel, A.; Pot, B. Probiotic Properties of Non-Conventional Lactic Acid Bacteria: Immunomodulation by *Oenococcus Oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, 140 (2–3), 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.007>.
- (22) Zakhia, F.; de Lajudie, P. La Taxonomie Bactérienne Moderne : Revue Des Techniques — Application à La Caractérisation Des Bactéries Nodulant Les Légumineuses (BNL). *Can. J. Microbiol.* **2006**, 52 (3), 169–181. <https://doi.org/10.1139/w05-092>.
- (23) Vandamme, P.; De Bruyne, K.; Pot, B. Phylogenetics and Systematics. In *Lactic Acid Bacteria*; John Wiley & Sons, Ltd, 2014; pp 31–44. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch3>.
- (24) Finale Roumi1.Pdf. <http://dspace.univ-tebessa.dz:8080/jspui/bitstream/123456789/808/1/finale%20roumi1.pdf> (accessed 2023-04-12).
- (25) Muyanja, C. M. B. K.; Narvhus, J. A.; Treimo, J.; Langsrud, T. Isolation, Characterisation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Bushera: A Ugandan Traditional Fermented Beverage. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, 80 (3), 201–210. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00148-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00148-4).
- (26) Garrity, G. M.; Bell, J. A.; Lilburn, T. G. TAXONOMIC OUTLINE OF THE PROKARYOTES BERGEY'S MANUAL® OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, SECOND EDITION.
- (27) Samelis, J.; Maurogenakis, F.; Metaxopoulos, J. Characterisation of Lactic Acid Bacteria Isolated from Naturally Fermented Greek Dry Salami. *Int. J. Food Microbiol.* **1994**, 23 (2), 179–196. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90051-5).
- (28) Leisner, J. J.; Vancanneyt, M.; Goris, J.; Christensen, H.; Rusul, G. 2000. Description of *Paralactobacillus Selangorensis* Gen. Nov., Sp. Nov., a New Lactic Acid Bacterium Isolated from Chili Bo, a Malaysian Food Ingredient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50** (1), 19–24. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-19>.
- (29) Makarova, K. S.; Koonin, E. V. Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria. *J. Bacteriol.* **2007**, 189 (4), 1199–1208. <https://doi.org/10.1128/JB.01351-06>.
- (30) Ennahar, S.; Cai, Y.; Fujita, Y. Phylogenetic Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Paddy Rice Silage as Determined by 16S Ribosomal DNA Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69 (1), 444–451. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.444-451.2003>.
- (31) Cai, Y.; Yang, J.; Pang, H.; Kitahara, M. 2011. *Lactococcus Fujiensis* Sp. Nov., a Lactic Acid Bacterium Isolated from Vegetable Matter. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61** (7), 1590–1594. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.025130-0>.
- (32) Cai, Y.; Pang, H.; Kitahara, M.; Ohkuma, M. 2012. *Lactobacillus Nasuensis* Sp. Nov., a Lactic Acid Bacterium Isolated from Silage, and Emended Description of the Genus *Lactobacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62** (Pt\_5), 1140–1144. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.031781-0>.
- (33) Vasiljevic, T.; Shah, N. P. Probiotics—From Metchnikoff to Bioactives. *Int. Dairy J.* **2008**, 18 (7), 714–728. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.004>.
- (34) Gaggia, F.; Mattarelli, P.; Biavati, B. Probiotics and Prebiotics in Animal Feeding for Safe Food Production. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, 141, S15–S28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>.
- (35) Khan, S. H. Probiotic Microorganisms- Identification, Metabolic and Physiological Impact on Poultry. *Worlds Poult. Sci. J.* **2013**, 69 (3), 601–612. <https://doi.org/10.1017/S0043933913000603>.
- (36) Faseleh Jahromi, M.; Wesam Altaher, Y.; Shokryazdan, P.; Ebrahimi, R.; Ebrahimi, M.; Idrus, Z.; Tufarelli, V.; Liang, J. B. Dietary Supplementation of a Mixture of *Lactobacillus* Strains Enhances Performance of Broiler Chickens Raised under Heat Stress Conditions. *Int. J. Biometeorol.* **2016**, 60 (7), 1099–1110. <https://doi.org/10.1007/s00484-015-1103-x>.

- (37) Peng, M.; Liu, J.; Liang, Z. Probiotic *Bacillus Subtilis* CW14 Reduces Disruption of the Epithelial Barrier and Toxicity of Ochratoxin A to Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *126*, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.009>.
- (38) Ambas, I.; Fotedar, R. Survival and Immunity of Marron *Cherax Cainii* (Austin, 2002) Fed *Bacillus Mycoides* Supplemented Diet under Simulated Transport. *J. Aquac. Res. Dev.* **2015**, *07*. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000390>.
- (39) Ambas, I.; Buller, N.; Fotedar, R. Isolation and Screening of Probiotic Candidates from Marron, *Cherax Cainii* (Austin, 2002) Gastrointestinal Tract (GIT) and Commercial Probiotic Products for the Use in Marron Culture. *J. Fish Dis.* **2015**, *38* (5), 467–476. <https://doi.org/10.1111/jfd.12257>.
- (40) Piewngam, P.; Zheng, Y.; Nguyen, T. H.; Dickey, S. W.; Joo, H.-S.; Villaruz, A. E.; Glose, K. A.; Fisher, E. L.; Hunt, R. L.; Li, B.; Chiou, J.; Pharkjaksu, S.; Khongthong, S.; Cheung, G. Y. C.; Kiratisin, P.; Otto, M. Pathogen Elimination by Probiotic *Bacillus* via Signalling Interference. *Nature* **2018**, *562* (7728), 532–537. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0616-y>.
- (41) Ramlucken, U.; Roets, Y.; Ramchuran, S. O.; Moonsamy, G.; Rensburg, C. J. van; Thantsha, M. S.; Lalloo, R. Isolation, Selection and Evaluation of *Bacillus* Spp. as Potential Multi-Mode Probiotics for Poultry. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2020**, *66* (4), 228–238. <https://doi.org/10.2323/jgam.2019.11.002>.
- (42) Barbosa, T. M.; Serra, C. R.; La Ragione, R. M.; Woodward, M. J.; Henriques, A. O. Screening for *Bacillus* Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (2), 968–978. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.968-978.2005>.
- (43) Shinde, T.; Vemuri, R.; Shastri, M. D.; Perera, A. P.; Tristram, S.; Stanley, R.; Eri, R. Probiotic *Bacillus Coagulans* MTCC 5856 Spores Exhibit Excellent In-Vitro Functional Efficacy in Simulated Gastric Survival, Mucosal Adhesion and Immunomodulation. *J. Funct. Foods* **2019**, *52*, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.031>.
- (44) Shivaramaiah, S.; Pumford, N. R.; Morgan, M. J.; Wolfenden, R. E.; Wolfenden, A. D.; Torres-Rodríguez, A.; Hargis, B. M.; Téllez, G. Evaluation of *Bacillus* Species as Potential Candidates for Direct-Fed Microbials in Commercial Poultry. *Poult. Sci.* **2011**, *90* (7), 1574–1580. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00745>.
- (45) Binnendijk, K. h.; Rijkers, G. t. What Is a Health Benefit? An Evaluation of EFSA Opinions on Health Benefits with Reference to Probiotics. *Benef. Microbes* **2013**, *4* (3), 223–230. <https://doi.org/10.3920/BM2013.0019>.
- (46) EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (EFSA FEEDAP Panel); Bampidis, V.; Azimonti, G.; Bastos, M. de L.; Christensen, H.; Dusemund, B.; Kouba, M.; Kos Durjava, M.; López-Alonso, M.; López Puente, S.; Marcon, F.; Mayo, B.; Pechová, A.; Petkova, M.; Ramos, F.; Sanz, Y.; Villa, R. E.; Woutersen, R.; Chesson, A.; Cocconcelli, P. S.; Rychen, G.; Wallace, R. J.; Anguita, M.; Brozzi, R.; Galobart, J.; Saarela, M. Safety and Efficacy of Probiotic Lactina® (*Enterococcus Faecium* NBIMCC 8270, *Lactobacillus Acidophilus* NBIMCC 8242, *Lactobacillus Helveticus* NBIMCC 8269, *Lactobacillus Delbrueckii* Ssp. *Lactis* NBIMCC 8250, *Lactobacillus Delbrueckii* Ssp. *Bulgaricus* NBIMCC 8244 and *Streptococcus Thermophilus* NBIMCC 8253) as a Feed Additive for Chickens for Fattening and Suckling and Weaned Rabbits. *EFSA J.* **2019**, *17* (3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5646>.
- (47) Dronkers, T. m. g.; Krist, L.; Van Overveld, F. j.; Rijkers, G. t. The Ascent of the Blessed: Regulatory Issues on Health Effects and Health Claims for Probiotics in Europe and the Rest of the World. *Benef. Microbes* **2018**, *9* (5), 717–723. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0196>.
- (48) Cutting, S. M. *Bacillus* Probiotics. *Food Microbiol.* **2011**, *28* (2), 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>.
- (49) Singh, A.; Hacini-Rachinel, F.; Gosoniu, M. L.; Bourdeau, T.; Holvoet, S.; Doucet-Ladeveze, R.; Beaumont, M.; Mercenier, A.; Nutten, S. Immune-Modulatory Effect of Probiotic *Bifidobacterium Lactis* NCC2818 in Individuals Suffering from Seasonal Allergic Rhinitis to Grass Pollen: An Exploratory, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2013**, *67* (2), 161–167. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2012.197>.

- (50)Duc, L. H.; Hong, H. A.; Cutting, S. M. Germination of the Spore in the Gastrointestinal Tract Provides a Novel Route for Heterologous Antigen Delivery. *Vaccine* **2003**, *21* (27), 4215–4224. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00492-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00492-4).
- (51)Luise, D.; Bosi, P.; Raff, L.; Amatucci, L.; Viridis, S.; Trevisi, P. Bacillus Spp. Probiotic Strains as a Potential Tool for Limiting the Use of Antibiotics, and Improving the Growth and Health of Pigs and Chickens. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 801827. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.801827>.
- (52)Villegier, R. Etude in vitro des propriétés probiotiques de bactéries du genre Bacillus: Interaction avec l'hôte et effets de l'association avec un prébiotique. 276.
- (53)Leser, T. d.; Knarreborg, A.; Worm, J. Germination and Outgrowth of Bacillus Subtilis and Bacillus Licheniformis Spores in the Gastrointestinal Tract of Pigs. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *104* (4), 1025–1033. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03633.x>.
- (54)Patel, A. K.; Deshattiwar, M. K.; Chaudhari, B. L.; Chincholkar, S. B. Production, Purification and Chemical Characterization of the Catecholate Siderophore from Potent Probiotic Strains of Bacillus Spp. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100* (1), 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.008>.
- (55)Patel, A. K.; Ahire, J. J.; Pawar, S. P.; Chaudhari, B. L.; Shouche, Y. S.; Chincholkar, S. B. Evaluation of Probiotic Characteristics of Siderophoregenic Bacillus Spp. Isolated from Dairy Waste. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *160* (1), 140. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8583-2>.
- (56)Im, E.; Pothoulakis, C. Recent Advances in Saccharomyces Boulardii Research. *Gastroentérologie Clin. Biol.* **2010**, *34*, S62–S70. [https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(10\)70023-3](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(10)70023-3).
- (57)EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Rychen, G.; Aquilina, G.; Azimonti, G.; Bampidis, V.; Bastos, M. de L.; Bories, G.; Chesson, A.; Cocconcelli, P. S.; Flachowsky, G.; Gropp, J.; Kolar, B.; Kouba, M.; López-Alonso, M.; López Puente, S.; Mantovani, A.; Mayo, B.; Ramos, F.; Saarela, M.; Villa, R. E.; Wallace, R. J.; Wester, P.; Anguita, M.; Galobart, J.; Innocenti, M. L. Guidance on the Identity, Characterisation and Conditions of Use of Feed Additives. *EFSA J.* **2017**, *15* (10), e05023. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5023>.
- (58)Siezen, R. J.; Kok, J.; Abee, T.; Schaafsma, G. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*; Springer Science & Business Media, 2002.
- (59)Wright, A. Regulating the Safety of Probiotics - The European Approach. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11* (1), 17–23. <https://doi.org/10.2174/1381612053382322>.
- (60)Nagpal, R.; Kumar, A.; Kumar, M.; Behare, P. V.; Jain, S.; Yadav, H. Probiotics, Their Health Benefits and Applications for Developing Healthier Foods: A Review. *FEMS Microbiol. Lett.* **2012**, *334*, 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02593.x>.
- (61)Coudeyras, S.; Forestier, C. Microbiote et Probiotiques : Impact En Santé Humaine. *Can. J. Microbiol.* **2010**, *56* (8), 611–650. <https://doi.org/10.1139/W10-052>.
- (62)Krysiak, K.; Konkol, D.; Korczyński, M. Overview of the Use of Probiotics in Poultry Production. *Animals* **2021**, *11* (6), 1620. <https://doi.org/10.3390/ani11061620>.
- (63)Rerksuppaphol, S.; Rerksuppaphol, L. *Lactobacillus Acidophilus* and *Bifidobacterium Bifidum* Stored at Ambient Temperature Are Effective in the Treatment of Acute Diarrhoea. *Ann. Trop. Paediatr.* **2010**, *30* (4), 299–304. <https://doi.org/10.1179/146532810X12858955921159>.
- (64)Marteau, P. Probiotics in Functional Intestinal Disorders and IBS: Proof of Action and Dissecting the Multiple Mechanisms. *Gut* **2010**, *59* (3), 285–286. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.173690>.
- (65)Valerio, F.; Russo, F.; de Candia, S.; Riezzo, G.; Orlando, A.; Lonigro, S. L.; Lavermicocca, P. Effects of Probiotic Lactobacillus Paracasei-Enriched Artichokes on Constipated Patients: A Pilot Study. *J. Clin. Gastroenterol.* **2010**, *44* (Supplement 1), S49–S53. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3181d2dca4>.
- (66)Coccorullo, P.; Strisciuglio, C.; Martinelli, M.; Miele, E.; Greco, L.; Staiano, A. Lactobacillus Reuteri (DSM 17938) in Infants with Functional Chronic Constipation: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *J. Pediatr.* **2010**, *157* (4), 598–602. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.04.066>.

- (67) Khani, S.; Hosseini, H.; Taheri, M.; R. Nourani, M.; A. Imani Fooladi, A. Probiotics as an Alternative Strategy for Prevention and Treatment of Human Diseases: A Review. *Inflamm. Allergy-Drug Targets* **2012**, *11* (2), 79–89. <https://doi.org/10.2174/187152812800392832>.
- (68) McFarland, L. V. Systematic Review and Meta-Analysis of *Saccharomyces Boulardii* in Adult Patients. *World J. Gastroenterol.* **2010**, *16* (18), 2202. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2202>.
- (69) Kourelis, A.; Kotzamanidis, C.; Litopoulou-Tzanetaki, E.; Papaconstantinou, J.; Tzanetakis, N.; Yiangou, M. Immunostimulatory Activity of Potential Probiotic Yeast Strains in the Dorsal Air Pouch System and the Gut Mucosa. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *109* (1), 260–271. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04651.x>.
- (70) Nguyen, T.; Brody, H.; Radaic, A.; Kapila, Y. Probiotics for Periodontal Health—Current Molecular Findings. *Periodontol. 2000* **2021**, *87* (1), 254–267. <https://doi.org/10.1111/prd.12382>.
- (71) Mor-Mur, M.; Yuste, J. Emerging Bacterial Pathogens in Meat and Poultry: An Overview. *Food Bioprocess Technol.* **2010**, *3* (1), 24–35. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0189-8>.
- (72) Allen, H. K.; Levine, U. Y.; Looft, T.; Bandrick, M.; Casey, T. A. Treatment, Promotion, Commotion: Antibiotic Alternatives in Food-Producing Animals. *Trends Microbiol.* **2013**, *21* (3), 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.001>.
- (73) Corcionivoschi, N.; Drinceanu, D.; Pop, I. M.; Stack, D. The Effect of Probiotics on Animal Health. *Sci. Pap.* **2010**, *8*.
- (74) Tuohy, K. M.; Rouzaud, G. C. M.; Bruck, W. M.; Gibson, G. R. Modulation of the Human Gut Microflora Towards Improved Health Using Prebiotics - Assessment of Efficacy. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11* (1), 75–90. <https://doi.org/10.2174/1381612053382331>.
- (75) Nava, G. M.; Bielke, L. R.; Callaway, T. R.; Castañeda, M. P. Probiotic Alternatives to Reduce Gastrointestinal Infections: The Poultry Experience. *Anim. Health Res. Rev.* **2005**, *6* (1), 105–118. <https://doi.org/10.1079/AHR2005103>.
- (76) Kabir, S. M. L. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10* (8), 3531–3546. <https://doi.org/10.3390/ijms10083531>.
- (77) Balcázar, J. L.; Blas, I. de; Ruiz-Zarzuola, I.; Cunningham, D.; Vendrell, D.; Múzquiz, J. L. The Role of Probiotics in Aquaculture. *Vet. Microbiol.* **2006**, *114* (3), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>.
- (78) Frizzo, L. S.; Signorini, M. L.; Rosmini, M. R. Probiotics and Prebiotics for the Health of Cattle. In *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*; Di Gioia, D., Biavati, B., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp 155–174. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71950-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71950-4_6).
- (79) Alori, E. T.; Glick, B. R.; Babalola, O. O. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Front. Microbiol.* **2017**, *8* (JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>.
- (80) Kumar, A.; Vandana; Singh, M.; Singh, P. P.; Singh, S. K.; Singh, P. K.; Pandey, K. D. Isolation of Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Their Impact on Growth and Curcumin Content in *Curcuma Longa* L. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2016**, *8*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.07.002>.
- (81) Qi, J.; Aiuchi, D.; Tani, M.; Asano, S.; Koike, M. Potential of Entomopathogenic *Bacillus Thuringiensis* as Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Biological Control Agents for Tomato Fusarium Wilt. *2* (6).
- (82) *Biopesticides: Importance and Challenges*; Apple Academic Press, 2021; pp 129–151. <https://doi.org/10.1201/9781003104957-6>.
- (83) Berg, G. Plant–Microbe Interactions Promoting Plant Growth and Health: Perspectives for Controlled Use of Microorganisms in Agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84* (1), 11–18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>.
- (84) Krysiak, K.; Konkol, D.; Korczyński, M. Overview of the Use of Probiotics in Poultry Production. *Animals* **2021**, *11* (6), 1620. <https://doi.org/10.3390/ani11061620>.
- (85) Dhiman, R.; Indramohan, M.; Barnes, P. F.; Nayak, R. C.; Paidipally, P.; Rao, L. V. M.; Vankayalapati, R. IL-22 Produced by Human NK Cells Inhibits Growth of Mycobacterium

- Tuberculosis by Enhancing Phagolysosomal Fusion. *J. Immunol.* **2009**, *183* (10), 6639–6645. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902587>.
- (86) Meddings, J. The Significance of the Gut Barrier in Disease. *Gut* **2008**, *57* (4), 438–440. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.143172>.
- (87) Porchet, N.; Buisine, M.-P.; Desseyn, J.-L.; Moniaux, N.; Nollet, S.; Degand, P.; Pigny, P.; Van Seuning, I.; Laine, A.; Aubert, J.-P. Gènes MUC : une superfamille de gènes ? Vers une classification fonctionnelle des apomucines humaines. *J. Société Biol.* **1999**, *193* (1), 85–99. <https://doi.org/10.1051/jbio/1999193010085>.
- (88) Zyrek, A. A.; Cichon, C.; Helms, S.; Enders, C.; Sonnenborn, U.; Schmidt, M. A. Molecular Mechanisms Underlying the Probiotic Effects of Escherichia Coli Nissle 1917 Involve ZO-2 and PKC $\zeta$  Redistribution Resulting in Tight Junction and Epithelial Barrier Repair. *Cell. Microbiol.* **2007**, *9* (3), 804–816. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00836.x>.
- (89) Mållner, H.; Westendorf, C.; Leitner, E.; Chernin, L.; Riedel, K.; Schmidt, S.; Eberl, L.; Berg, G. Quorum-Sensing Effects in the Antagonistic Rhizosphere Bacterium Serratia Plymuthica HRO-C48: Biocontrol and Quorum Sensing in Serratia Plymuthica. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *67* (3), 468–478. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00635.x>.
- (90) van Keulen, G. Microbiology Challenges and Opportunities in Soil Health. *Microbiology* **2021**, *167* (1), 001001. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001001>.
- (91) Kamilova, F.; Validov, S.; Azarova, T.; Mulders, I.; Lugtenberg, B. Enrichment for Enhanced Competitive Plant Root Tip Colonizers Selects for a New Class of Biocontrol Bacteria. *Environ. Microbiol.* **2005**, *7* (11), 1809–1817. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00889.x>.
- (92) Danhorn, T.; Fuqua, C. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61* (1), 401–422. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>.
- (93) McFall-Ngai, M.; Hadfield, M. G.; Bosch, T. C. G.; Carey, H. V.; Domazet-Lošo, T.; Douglas, A. E.; Dübilier, N.; Eberl, G.; Fukami, T.; Gilbert, S. F.; Hentschel, U.; King, N.; Kjelleberg, S.; Knoll, A. H.; Kremer, N.; Mazmanian, S. K.; Metcalf, J. L.; Nealson, K.; Pierce, N. E.; Rawls, J. F.; Reid, A.; Ruby, E. G.; Rumpho, M.; Sanders, J. G.; Tautz, D.; Wernegreen, J. J. Animals in a Bacterial World, a New Imperative for the Life Sciences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110* (9), 3229–3236. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218525110>.
- (94) Kim, Y. C.; Anderson, A. J. Rhizosphere Pseudomonads as Probiotics Improving Plant Health. *Mol. Plant Pathol.* **2018**, *19* (10), 2349–2359. <https://doi.org/10.1111/mpp.12693>.
- (95) Schlee, M.; Wehkamp, J.; Altenhoefer, A.; Oelschlaeger, T. A.; Stange, E. F.; Fellermann, K. Induction of Human  $\beta$ -Defensin 2 by the Probiotic Escherichia Coli Nissle 1917 Is Mediated through Flagellin. *Infect. Immun.* **2007**, *75* (5), 2399–2407. <https://doi.org/10.1128/IAI.01563-06>.
- (96) Raaijmakers, J. M.; de Bruijn, I.; de Kock, M. J. D. Cyclic Lipopeptide Production by Plant-Associated Pseudomonas Spp.: Diversity, Activity, Biosynthesis, and Regulation. *Mol. Plant-Microbe Interactions* **2006**, *19* (7), 699–710. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0699>.
- (97) Gullian, M.; Thompson, F.; Rodriguez, J. Selection of Probiotic Bacteria and Study of Their Immunostimulatory Effect in Penaeus Vannamei. *Aquaculture* **2004**, *233* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.013>.
- (98) Kreth, J.; Zhang, Y.; Herzberg, M. C. Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: Streptococcus Sanguinis and Streptococcus Gordonii Interference with Streptococcus Mutans. *J. Bacteriol.* **2008**, *190* (13), 4632–4640. <https://doi.org/10.1128/JB.00276-08>.
- (99) Kitazawa, H.; Ino, T.; Kawai, Y.; Itoh, T.; Saito, T. A Novel Immunostimulating Aspect of Lactobacillus Gasseri: Induction of “Gasserokine” as Chemoattractants for Macrophages. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *77* (1–2), 29–38. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00045-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00045-4).
- (100) OCDE; Organisation des Nations Unies pour l’alimentation et l’agriculture. *Perspectives agricoles de l’OCDE et de la FAO 2022-2031*; Perspectives agricoles de l’OCDE et de la FAO; OECD, 2022. <https://doi.org/10.1787/63c6c63f-fr>.
- (101) Butel, M.-J. Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *J. Anti-Infect.* **2014**, *16* (2), 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2014.01.010>.
- (102) Foerst, P.; Santivarangkna, C. Advances in Probiotic Technology. 224.

- (103) Souhila, B.; Asma, B.; Boumediene, M.; Aicha, T.-T. Antimicrobial Activity of Dried Fig (*Ficus Carica* L.) Extracts from the Region of Mascara (Western Algeria) on Enterobacter Cloacae Identified by MALDI-TOF/MS. *Eur. J. Biol. Res.* **2021**, *11* (2), 234–241.
- (104) Lessard, M. Utilisation des probiotiques chez le porc – modulateurs potentiels de la santé intestinale. **2004**.
- (105) Singhal, N.; Kumar, M.; Kanaujia, P. K.; Viridi, J. S. MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Emerging Technology for Microbial Identification and Diagnosis. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*.
- (106) El Jeni, R.; Bohme, K.; Velasquez, J.; El Bour, M.; Bouhaouala-Zahar, B. Analyse comparative de spectres protéomiques et phylogénétiques de 18 souches de bactéries lactiques a potentiel probiotique isolées à partir de poissons, Actes du Vème meeting: Innovation dans le secteur Halio-Alimentaire et Bioproduits: Développement de nouvelles procédures II, Gammarth 27-29 juillet 2015. **2015**.
- (107) Murray, P. R. What Is New in Clinical Microbiology—Microbial Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J. Mol. Diagn.* **2012**, *14* (5), 419–423. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.03.007>.
- (108) Fagerquist, C. K.; Garbus, B. R.; Miller, W. G.; Williams, K. E.; Yee, E.; Bates, A. H.; Boyle, S.; Harden, L. A.; Cooley, M. B.; Mandrell, R. E. Rapid Identification of Protein Biomarkers of Escherichia Coli O157:H7 by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight–Time-of-Flight Mass Spectrometry and Top-Down Proteomics. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (7), 2717–2725. <https://doi.org/10.1021/ac902455d>.
- (109) De MAN, J. C.; Rogosa, M.; Sharpe, M. E. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **1960**, *23* (1), 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>.
- (110) Terzaghi, B. E.; Sandine, W. E. Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **1975**, *29* (6), 807–813. <https://doi.org/10.1128/am.29.6.807-813.1975>.
- (111) Šušković, J.; Kos, B.; Matošić, S.; Besendorfer, V. The Effect of Bile Salts on Survival and Morphology of a Potential Probiotic Strain Lactobacillus Acidophilus M92. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *16* (7), 673–678. <https://doi.org/10.1023/A:1008909505651>.
- (112) Makino, H.; Kushiro, A.; Ishikawa, E.; Muylaert, D.; Kubota, H.; Sakai, T.; Oishi, K.; Martin, R.; Ben Amor, K.; Oozeer, R.; Knol, J.; Tanaka, R. Transmission of Intestinal Bifidobacterium Longum Subsp. Longum Strains from Mother to Infant, Determined by Multilocus Sequencing Typing and Amplified Fragment Length Polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77* (19), 6788–6793. <https://doi.org/10.1128/AEM.05346-11>.
- (113) Ferraris, L.; Aires, J.; Waligora-Dupriet, A.-J.; Butel, M.-J. New Selective Medium for Selection of Bifidobacteria from Human Feces. *Anaerobe* **2010**, *16* (4), 469–471. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.03.008>.
- (114) Camaschella, P.; Mignot, O.; Pirovano, F.; Sozzi, T. Method for Differentiated Enumeration of Mixed Cultures of Thermophilic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria by Using Only One Culture Medium. *Le Lait* **1998**, *78* (4), 461–467. <https://doi.org/10.1051/lait:1998444>.
- (115) Riegel, P.; Briel, D. de; Dauwalder, O. Automatisation de l'identification bactérienne. *Rev. Francoph. Lab.* **2016**, *2016* (482), 39–47. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(16\)30171-X](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(16)30171-X).
- (116) Nacef, M.; Chevalier, M.; Chollet, S.; Drider, D.; Flahaut, C. MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from a French Cheese: The Maroilles. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *247*, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005>.
- (117) Kostrzewa, M.; Schubert, S. *MALDI-TOF Mass: Spectrometry in Microbiology*; Caister academic press: Norfolk, 2016.
- (118) Mohamed Abdelhafid HAMIDECHI, K. K. ISSN 2320-5407 International Journal of Advanced Research (2014), Volume 2, Issue 4 ,1073-1081. *Int. J. Adv. Res.* **2014**, *2* (4).
- (119) Prasanna, P. H. P.; Bell, A.; Grandison, A. S.; Charalampopoulos, D. Emulsifying, Rheological and Physicochemical Properties of Exopolysaccharide Produced by Bifidobacterium Longum Subsp. Infantis CCUG 52486 and Bifidobacterium Infantis NCIMB 702205. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90* (1), 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.075>.

- (120) Allouche, F. N.; Hellal, A.; Laraba, A. Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière.
- (121) Prasad, J.; Gill, H.; Smart, J.; Gopal, P. K. Selection and Characterisation of Lactobacillus and Bifidobacterium Strains for Use as Probiotics. *Int. Dairy J.* **1998**, *8* (12), 993–1002. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00024-2).
- (122) Ammor, S.; Tauveron, G.; Dufour, E.; Chevallier, I. Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria against Spoilage and Pathogenic Bacteria Isolated from the Same Meat Small-Scale Facility: 1—Screening and Characterization of the Antibacterial Compounds. *Food Control* **2006**, *17* (6), 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.02.006>.
- (123) Zhu, W. m.; Liu, W.; Wu, D. q. Isolation and Characterization of a New Bacteriocin from Lactobacillus Gasseri KT7. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88* (5), 877–886. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01027.x>.
- (124) CASFM-V1\_0-FEV\_2018.Pdf. [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/CASFM-V1\\_0-FEV\\_2018.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/CASFM-V1_0-FEV_2018.pdf) (accessed 2023-05-21).
- (125) Ma, W. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Sixteenth Informational Supplement. *M 100- 16* **2006**.
- (126) Del Re, B.; Sgorbati, B.; Miglioli, M.; Palenzona, D. Adhesion, Autoaggregation and Hydrophobicity of 13 Strains of Bifidobacterium Longum. *Lett. Appl. Microbiol.* **2000**, *31* (6), 438–442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x>.
- (127) Rosenberg, M.; Gutnick, D.; Rosenberg, E. Adherence of Bacteria to Hydrocarbons: A Simple Method for Measuring Cell-Surface Hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **1980**, *9* (1), 29–33. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x>.
- (128) Rühls, P. A.; Böcker, L.; Inglis, R. F.; Fischer, P. Studying Bacterial Hydrophobicity and Biofilm Formation at Liquid–Liquid Interfaces through Interfacial Rheology and Pendant Drop Tensiometry. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, *117*, 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.023>.
- (129) Ahimou, F.; Paquot, M.; Jacques, P.; Thonart, P.; Rouxhet, P. G. Influence of Electrical Properties on the Evaluation of the Surface Hydrophobicity of Bacillus Subtilis. *J. Microbiol. Methods* **2001**, *45* (2), 119–126. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00240-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00240-8).
- (130) Wouters, T. de; Jans, C.; Niederberger, T.; Fischer, P.; Rühls, P. A. Adhesion Potential of Intestinal Microbes Predicted by Physico-Chemical Characterization Methods. *PLOS ONE* **2015**, *10* (8), e0136437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136437>.
- (131) Chahrazed, B.; Souhila, A.; Amine, B.; Mohamed, Z. L. ETUDE DU POTENTIEL PROBIOTIQUE DES BACTERIES. *Algerian J. Arid Environ.* **11**, 10.
- (132) Oldak, A.; Zielińska, D.; Rzepkowska, A.; Kołożyn-Krajewska, D. Comparison of Antibacterial Activity of *Lactobacillus Plantarum* Strains Isolated from Two Different Kinds of Regional Cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski Cheese. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, e6820369. <https://doi.org/10.1155/2017/6820369>.
- (133) Mann, A.; Nehra, K.; Rana, J. S.; Dahiya, T. Antibiotic Resistance in Agriculture: Perspectives on Upcoming Strategies to Overcome Upsurge in Resistance. *Curr. Res. Microb. Sci.* **2021**, *2*, 100030. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100030>.
- (134) Yu, Q.; Yuan, L.; Deng, J.; Yang, Q. Lactobacillus Protects the Integrity of Intestinal Epithelial Barrier Damaged by Pathogenic Bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2015**, *5*.
- (135) Song, D.; Ibrahim, S.; Hayek, S. Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. In *Probiotics*; Rigobelo, E., Ed.; InTech, 2012. <https://doi.org/10.5772/50121>.
- (136) Blondiaux, N.; Gaillot, O.; Courcol, R.-J. Identification bactérienne par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF : évaluation au CHU de Lille. *Pathol. Biol.* **2010**, *58* (1), 55–57. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.07.020>.
- (137) Tanigawa, K.; Kawabata, H.; Watanabe, K. Identification and Typing of Lactococcus Lactis by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76* (12), 4055–4062. <https://doi.org/10.1128/AEM.02698-09>.
- (138) Angelakis, E.; Million, M.; Henry, M.; Raoult, D. Rapid and Accurate Bacterial Identification in Probiotics and Yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J. Food Sci.* **2011**, *76* (8), M568–M572. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02369.x>.

- (139) Veloo, A. C. M.; Erhard, M.; Welker, M.; Welling, G. W.; Degener, J. E. Identification of Gram-Positive Anaerobic Cocci by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Syst. Appl. Microbiol.* **2011**, *34* (1), 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.005>.
- (140) Carbonnelle, E.; Beretti, J.-L.; Cottyn, S.; Quesne, G.; Berche, P.; Nassif, X.; Ferroni, A. Rapid Identification of Staphylococci Isolated in Clinical Microbiology Laboratories by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45* (7), 2156–2161. <https://doi.org/10.1128/jcm.02405-06>.
- (141) Lawton, S. J.; Weis, A. M.; Byrne, B. A.; Fritz, H.; Taff, C. C.; Townsend, A. K.; Weimer, B. C.; Mete, A.; Wheeler, S.; Boyce, W. M. Comparative Analysis of *Campylobacter* Isolates from Wild Birds and Chickens Using MALDI-TOF MS, Biochemical Testing, and DNA Sequencing. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2018**, *30* (3), 354–361. <https://doi.org/10.1177/1040638718762562>.
- (142) Ayeni, F. A.; Sánchez, B.; Adeniyi, B. A.; de Los Reyes-Gavilán, C. G.; Margolles, A.; Ruas-Madiedo, P. Evaluation of the Functional Potential of Weissella and Lactobacillus Isolates Obtained from Nigerian Traditional Fermented Foods and Cow's Intestine. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *147* (2), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.014>.
- (143) Teuber, M.; Meile, L.; Schwarz, F. Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Food. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the Sixth Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, 19–23 September 1999, Veldhoven, The Netherlands*; Konings, W. N., Kuipers, O. P., In 't Veld, J. H. J. H., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1999; pp 115–137. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2027-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2027-4_5).
- (144) Kumar, V.; Sheoran, P.; Gupta, A.; Yadav, J.; Tiwari, S. K. Antibacterial Property of Bacteriocin Produced by Lactobacillus Plantarum LD4 Isolated from a Fermented Food. *Ann. Microbiol.* **2016**, *66* (4), 1431–1440. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1230-6>.
- (145) Gaggia, F.; Mattarelli, P.; Biavati, B. Probiotics and Prebiotics in Animal Feeding for Safe Food Production. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *141*, S15–S28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>.
- (146) Sadrin, S. Evaluation du bénéfice chez l'homme des probiotiques dans la prise en charge du syndrome de l'intestin irritable : méthodologie de l'essai contrôlé randomisé et allégations nutritionnelles et de santé. phdthesis, Université de Toulon, 2017. <https://theses.hal.science/tel-01806343> (accessed 2023-05-21).
- (147) Tejero-Sariñena, S.; Barlow, J.; Costabile, A.; Gibson, G. R.; Rowland, I. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of a Range of Probiotics against Pathogens: Evidence for the Effects of Organic Acids. *Anaerobe* **2012**, *18* (5), 530–538. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.08.004>.
- (148) Wang, Y.; Wu, J.; Lv, M.; Shao, Z.; Hungwe, M.; Wang, J.; Bai, X.; Xie, J.; Wang, Y.; Geng, W. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>.
- (149) Wen, L. S.; Philip, K.; Ajam, N. Purification, Characterization and Mode of Action of Plantaricin K25 Produced by Lactobacillus Plantarum. *Food Control* **2016**, *60*, 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.010>.
- (150) Kumagai, P. S.; Sousa, V. K.; Donato, M.; Itri, R.; Beltramini, L. M.; Araujo, A. P. U.; Buerck, J.; Wallace, B. A.; Lopes, J. L. S. Unveiling the Binding and Orientation of the Antimicrobial Peptide Plantaricin 149 in Zwitterionic and Negatively Charged Membranes. *Eur. Biophys. J.* **2019**, *48* (7), 621–633. <https://doi.org/10.1007/s00249-019-01387-y>.
- (151) Wong, A.; Ngu, D. Y. S.; Dan, L. A.; Ooi, A.; Lim, R. L. H. Detection of Antibiotic Resistance in Probiotics of Dietary Supplements. *Nutr. J.* **2015**, *14* (1), 95. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0084-2>.
- (152) Wang, Y.; Li, A.; Jiang, X.; Zhang, H.; Mehmood, K.; Zhang, L.; Jiang, J.; Waqas, M.; Iqbal, M.; Li, J. Probiotic Potential of Leuconostoc Pseudomesenteroides and Lactobacillus Strains Isolated From Yaks. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*.
- (153) Turgay, Ö.; ErbiLiR, F. Isolation and Characterization of Lactobacillus Bulgaricus and Lactobacillus Casei from Various Foods.

- (154) Wu, A.; Fu, Y.; Kong, L.; Shen, Q.; Liu, M.; Zeng, X.; Wu, Z.; Guo, Y.; Pan, D. Production of a Class IIb Bacteriocin with Broad-Spectrum Antimicrobial Activity in *Lactiplantibacillus Plantarum* RUB1. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2021**, *13* (6), 1820–1832. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09815-2>.
- (155) das Neves Selis, N.; de Oliveira, H. B. M.; Leão, H. F.; dos Anjos, Y. B.; Sampaio, B. A.; Correia, T. M. L.; Almeida, C. F.; Pena, L. S. C.; Reis, M. M.; Brito, T. L. S.; Brito, L. F.; Campos, G. B.; Timenetsky, J.; Cruz, M. P.; Rezende, R. P.; Romano, C. C.; da Costa, A. M.; Yatsuda, R.; Uetanabaro, A. P. T.; Marques, L. M. *Lactiplantibacillus Plantarum* Strains Isolated from Spontaneously Fermented Cocoa Exhibit Potential Probiotic Properties against *Gardnerella Vaginalis* and *Neisseria Gonorrhoeae*. *BMC Microbiol.* **2021**, *21* (1), 198. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02264-5>.
- (156) Franz, C. M.; Specht, I.; Haberer, P.; Holzapfel, W. H. Bile Salt Hydrolase Activity of Enterococci Isolated from Food: Screening and Quantitative Determination. *J. Food Prot.* **2001**, *64* (5), 725–729. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.5.725>.
- (157) Adesokan, I.; Sanni, A.; Kanwar, S. *In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of Indigenous Yeasts Isolated from Nigerian Fermented Food Products*; 2021. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33906.43206>.