

## **Efficacité des probiotiques en aquaculture : étude du cas de *Bacillus subtilis* chez le Tilapia du Nil (*Oreochromis Niloticus*)**

**Auteur :** Dupont, Estelle

**Promoteur(s) :** Daube, Georges

**Faculté :** Faculté de Médecine Vétérinaire

**Diplôme :** Master en médecine vétérinaire

**Année académique :** 2024-2025

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/23468>

---

### *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.*

---

**Efficacité des probiotiques en  
aquaculture : étude du cas de *Bacillus  
subtilis* chez le Tilapia du Nil  
(*Oreochromis Niloticus*)**

***Efficacy of probiotics in aquaculture: case  
study of *Bacillus subtilis* in the Nile tilapia  
(*Oreochromis Niloticus*)***

**Estelle Dupont**

**Travail de fin d'études**  
présenté en vue de l'obtention du grade  
de Médecin vétérinaire

Année académique 2024/2025

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

**Efficacité des probiotiques en  
aquaculture : étude du cas de *Bacillus*  
*subtilis* chez le Tilapia du Nil  
(*Oreochromis Niloticus*)**

***Efficacy of probiotics in aquaculture: case  
study of *Bacillus subtilis* in the Nile tilapia  
(*Oreochromis Niloticus*)***

**Estelle Dupont**

Tuteur : Daube Georges

**Travail de fin d'études**

présenté en vue de l'obtention du grade  
de Médecin vétérinaire

Année académique 2024/2025

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

# **Efficacité des probiotiques en aquaculture : étude du cas de *Bacillus subtilis* chez le Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*)**

Objectif du travail :

Ce travail a pour but d'évaluer et comprendre les mécanismes permettant à *Bacillus subtilis* de lutter contre les agents pathogènes ainsi que ses effets in vitro. Il vise également à montrer les effets observés chez le Tilapia du Nil à la suite de l'administration de cette bactérie en tant que probiotique, au niveau immunitaire et de ce fait au niveau de la résistance aux pathogènes et à divers stress provoqués par les conditions d'élevage.

Résumé :

L'aquaculture est un mode d'élevage en constante évolution avec une production en croissance de plus en plus importante. Parallèlement à cela, l'émergence de bactéries résistantes à divers antibiotiques est également croissante. Afin de pouvoir concilier cet élevage prenant de plus en plus d'ampleur et la limitation souhaitable de l'usage des antibiotiques, les probiotiques constituent une alternative prometteuse. De nombreuses études ont été consacrées à diverses espèces bactériennes appartenant notamment aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* mais aussi *Bacillus*. Les *Bacillus* sont des bactéries Gram positives, présentant la capacité de sporuler et, de ce fait, de résister à des conditions rudes telles que la chaleur, la dessiccation ou encore à certains composés chimiques. *Bacillus subtilis* est l'espèce la plus étudiée à l'heure actuelle. Cette bactérie produit un panel important de substances à action antimicrobienne, des lantibiotiques faisant partie de la famille des bactériocines, des lipopeptides, et dispose également de la capacité à interrompre les signaux intervenant dans le « quorum sensing ». Leur reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte permet également d'accroître son efficacité et de montrer une résistance accrue face à divers pathogènes ou stress. De nombreuses souches de *Bacillus subtilis* ont été étudiées pour leurs effets sur l'immunité, la résistance aux pathogènes chez les poissons d'élevage tels que le Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*), l'une des espèces les plus élevées au niveau mondial. Bien que la compréhension des aptitudes de cette bactérie soit grandissante, les mécanismes d'action précis et les conditions d'utilisation optimale restent encore à mieux définir.

# ***Efficacy of probiotics in aquaculture: case study of *Bacillus subtilis* in the Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*)***

Aim of the work :

The aim of this work is to evaluate and understand the mechanisms that enable *Bacillus subtilis* to control pathogens. It also aims to show the effects observed in Nile tilapia, following administration of this bacterium as a probiotic, at the immune level and thus at the level of resistance to pathogens and to various stresses caused by breeding conditions.

Summary :

Aquaculture is a constantly evolving mode of farming with an ever-increasing production. At the same time, the emergence of bacteria resistant to various antibiotics is also increasing. Probiotics are a promising alternative for reconciling the growing importance of animal husbandry with the limited use of antibiotics. Many bacterial species were studied for this purpose, especially from the *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* as well as *Bacillus* genera. *Bacillus* are Gram-positive bacteria, with the ability to sporulate and thus resist harsh conditions such as heat, dessication or certain chemical compounds. *Bacillus subtilis* is the most studied species at present. This bacterium produces a large number of antimicrobial substances, lantibiotics belonging to the bacteriocins family, lipopeptides and also has the ability to interrupt signals involved in the “quorum sensing”. Their recognition by the host’s immune system also increases the effectiveness of the host immunity and shows increased resistance to various pathogens or stress. Many strains of *Bacillus subtilis* are being studied for their effects on immunity, especially for resistance to pathogens in farmed fish such as Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), one of the highest species worldwide. Although the understanding of this bacterium’s abilities is growing, the precise mechanisms of action and conditions for optimal use are still to be better defined.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenues et qui m'ont permis de mener à bien ce projet de fin d'étude. Merci à mon tuteur Mr Georges Daube, le professeur Mr Alain Vanderplasschen, l'ensemble des piscicultures ayant répondu au sondage ainsi qu'à ma famille.

## Table des matières

1.	Introduction .....	7
1.1.	Contexte général de l'aquaculture mondiale avec une attention particulière pour le Tilapia du Nil.....	7
1.2.	Enjeux sanitaires et environnementaux liés à l'utilisation des antibiotiques et au développement de l'antibiorésistance .....	7
1.3.	Alternatives à l'usage des antibiotiques.....	8
1.4.	Les probiotiques.....	8
1.4.1.	Définition .....	8
1.4.2.	Rôle .....	8
1.5.	<i>Bacillus</i> spp. comme probiotique.....	9
1.5.1.	Caractéristiques .....	9
1.5.2.	Mécanismes d'action .....	9
1.5.3.	Sécurité des souches probiotiques utilisées .....	10
1.5.4.	Résistance des souches probiotiques utilisées .....	10
2.	Mécanismes d'action de <i>Bacillus subtilis</i> et démonstration <i>in vitro</i> .....	11
2.1.	Peptides anti-microbiens .....	11
2.1.1.	Les bactériocines.....	11
2.1.2.	Les lantibiotiques.....	11
2.1.3.	Les lipopeptides .....	14
2.2.	Le quorum quenching .....	18
3.	Effets de l'efficacité de <i>Bacillus subtilis</i> <i>in vivo</i> sur le Tilapia du Nil. ....	19
3.1.	Sur l'immunité.....	20
3.1.1.	Détection des agents bactériens par l'hôte .....	20
3.1.2.	Le lysozyme de type C et mécanismes d'autoprotection de <i>Bacillus subtilis</i> .....	20
3.2.	Résistance au stress et aux pathogènes .....	23
3.3.	Conservation.....	25
3.4.	Viabilité et persistance après ingestion .....	25
3.5.	Modalités d'administration .....	25
3.6.	Impacts de la durée d'administration .....	26
3.7.	Association de probiotiques .....	26
4.	Discussion .....	27
5.	Conclusion .....	32
6.	Bibliographie .....	33

# 1. Introduction

## 1.1. Contexte général de l'aquaculture mondiale avec une attention particulière pour le Tilapia du Nil

Le secteur de l'aquaculture est en constante évolution et ne fait que croître. En 2022, la production mondiale de produits animaux d'origine aquatique a atteint les 185,4 millions de tonnes dont 94,4 tonnes sont issues de l'aquaculture. La majeure partie de la production aquacole est localisée en Asie, avec comme principal producteur la Chine. En ce qui concerne le Tilapia du Nil, sa production annuelle est d'environ 5 millions de tonnes. Il s'agit donc de l'espèce des poissons la plus représentée dans l'élevage en aquaculture. (*The State of World Fisheries and Aquaculture 2024*, 2024). De plus, en termes d'études réalisées, le Tilapia du Nil se trouve être l'espèce la plus employée pour l'accomplissement de tests *in vivo* (Calcagnile et al., 2024).

## 1.2. Enjeux sanitaires et environnementaux liés à l'utilisation des antibiotiques et au développement de l'antibiorésistance

Tout système de production est concerné par le développement de résistances bactériennes aux antibiotiques et l'aquaculture ne constitue pas une exception (Hazards (BIOHAZ) et al., 2021). Lorsque des antibiotiques sont utilisés, ils ne sont généralement pas totalement métabolisés et peuvent donc entrer en contact avec d'autres organismes (Dafale et al., 2020). L'eau, les sédiments ainsi que les aliments sont donc des sources potentielles de transmission de gènes de résistance entre bactéries (Hazards (BIOHAZ) et al., 2021).

Le transfert de ce type de gènes peut se faire entre micro-organismes, qu'ils soient pathogènes ou non, et peu importe qu'ils soient d'origine animale ou humaine. La résistance de certains pathogènes à de nombreux antibiotiques, qui peuvent affecter aussi bien l'Homme que les animaux, est directement reliée à l'utilisation des antibiotiques dans les domaines de l'élevage, dont l'aquaculture fait partie.

En aquaculture, les antibiotiques sont incorporés aux aliments ou directement injectés dans l'eau des bassins, ce qui engendre un contact important entre ces substances et l'environnement. Des analyses de l'eau de distribution de plusieurs villes du Michigan et de l'Ohio ont été réalisées afin d'y rechercher la présence de gènes de résistance. Ces recherches ont permis de détecter des bactéries résistantes à pas moins de 7 antibiotiques différents. La



présence de ces antibiotiques en permanence dans divers milieux, même en faible quantité, accroît la pression existante sur diverses bactéries et favorise en conséquence la sélection d'agents pathogènes multirésistants. (Dafale et al., 2020).

Au Kenya, des Tilapia du Nil ont été prélevés sur un marché de manière à réaliser des analyses bactériologiques en vue de mettre en évidence la présence (ou non) des bactéries résistantes à divers antibiotiques. Dans ces poissons, des bactéries de type *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* ainsi que *Vibrio parahaemolyticus* ont été trouvées. L'ensemble de ces bactéries contenaient divers gènes de résistances actifs contre au moins un des antibiotiques utilisés. Cet exemple laisse à penser que le consommateur peut très facilement entrer en contact avec des bactéries porteuses de gènes de résistance et que leur dissémination est aisée. (Mumbo et al., 2023)

### 1.3. Alternatives à l'usage des antibiotiques.

Au vu de ces éléments, il paraît nécessaire d'élaborer des stratégies afin de gérer au mieux les résidus d'antibiotiques pouvant se trouver dans les eaux d'élevages lorsque leur utilisation est requise et de trouver des alternatives à l'utilisation de ces agents antimicrobiens. C'est dans cet ordre d'idée que des recherches sont menées. Il peut s'agir de vaccins, de l'utilisation de bactériophages, de probiotiques, de prébiotiques, de certaines herbes médicinales, ... (Kılıç and Gültekin, 2024)

### 1.4. Les probiotiques

#### 1.4.1. Définition

Les probiotiques sont définis comme étant « micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate confèrent un avantage pour la santé de l'hôte ».

On peut les classer de manière différente selon que ce soit des bactéries ou non, selon leur capacité à produire des spores, selon leur composition constituée d'un seul ou de plusieurs micro-organismes ou encore si le type de micro-organisme fait partie de la flore commensale de l'hôte. (Calcagnile et al., 2024).

#### 1.4.2. Rôle

La liste des mécanismes mis en œuvre par les bactéries utilisées en tant que probiotique est longue. Elles permettent la digestion et l'absorption accrue de nutriments à la suite de la sécrétion d'enzymes telles que des protéases, des chitinases, des lipases, ..., l'amélioration de

la barrière intestinale, la modulation du système immunitaire et permettent le bon équilibre de la flore commensale. (Kuebutornye et al., 2019; Calcagnile et al., 2024). Les probiotiques jouent également un rôle positif au niveau de l'environnement des poissons, en améliorant la qualité de l'eau : toute une série de paramètres sont influencés notamment par les *Bacillus* en jouant sur le pH, la conductivité, l'oxygène dissous, l'azote et le phosphate. Ils peuvent aussi diminuer la quantité de métaux lourds et permettent le recyclage des nutriments en dégradant les matières organiques résiduelles (Calcagnile et al., 2024).

Les bactéries Gram négatives disposent de lipopolysaccharides qui sont considérés comme étant des endotoxines, expliquant donc que la majorité des probiotiques découverts font partie de la famille des Gram positives, qui n'en disposent pas mais pourraient posséder d'autres types de facteurs de virulence. Il est donc essentiel de séquencer le génome des potentiels probiotiques pour s'assurer de l'absence de ce type de facteurs. Il en va de même pour les gènes de résistance aux antibiotiques. Les genres les plus utilisées de bactéries Gram positives sont les *Lactobacillus*, *Bacillus* et *Bifidobacterium* (Calcagnile et al., 2024).

## 1.5. *Bacillus* spp. comme probiotique

### 1.5.1. Caractéristiques

Les espèces de *Bacillus* sont des bactéries de type Gram positif, en bâtonnet et ayant la capacité de sporuler. Cette forme leur confère une résistance accrue à diverses conditions telles que la dessiccation, les fortes chaleurs ou encore certains produits nettoyants/désinfectants. (Kuebutornye et al., 2019).

### 1.5.2. Mécanismes d'action

Les bactéries du genre *Bacillus* ont une capacité à sécréter des bactériocines possédant des effets antibactériens. D'autres molécules produites, telles que les lipopeptides, disposent de cette capacité de dégradation de bactéries, champignons et virus. Ils sont également antibiofilms, en empêchant leur formation notamment par les bactéries. Leur culture est aisée du fait de leur taux de réplication rapide, de leurs besoins nutritionnels faibles et de leur capacité à résister dans des conditions anaérobies une fois sous la forme de spores (Petit et al., 2024).

L'ensemble de ces facteurs en font des bactéries de choix à étudier dans un but d'utilisation en tant que probiotique (Petit et al., 2024). Dans le genre *Bacillus* on peut pointer *Bacillus*

*subtilis*, qui est l'espèce la plus utilisée à l'heure actuelle pour la réalisation de tests d'efficacité *in vitro* et *in vivo* (Calcagnile et al., 2024).

### 1.5.3. Sécurité des souches probiotiques utilisées

D'autres éléments sont à prendre en considération lors de la recherche de potentielles souches pouvant être utilisées comme probiotiques.

Tout d'abord, il est important de connaître la sécurité de la souche utilisée en tant que probiotique, afin que cette dernière ne puisse porter préjudice à son hôte suite à son administration. A cet égard, l'activité hémolytique des nouvelles souches étudiées est vérifiée en utilisant une culture de la bactérie en question et en l'appliquant sur une gélose sang. Dans le cas où une zone plus claire apparaît, le test est positif, ce qui signifie que la bactérie possède cette capacité d'hémolyse, lui conférant un pouvoir pathogène lui permettant la dégradation des globules rouges. Des tests *in vivo*, avec les probiotiques potentiels, sont également nécessaires pour attester de cette sûreté. Dans le cas de *Bacillus subtilis* LR1, aucune activité hémolytique ne fut observée. (Banerjee et al., 2017).

Il est également nécessaire de s'assurer que les souches susceptibles d'être utilisées en tant que probiotiques ne disposent pas de gènes de résistance aux antibiotiques, afin d'assurer qu'elles ne puissent pas participer au phénomène d'antibiorésistance ou encore de facteurs de virulence, afin de garantir qu'elles ne soient pas pathogènes. (Calcagnile et al., 2024)

### 1.5.4. Résistance des souches probiotiques utilisées

Il est en outre important de tenir compte de leur résistance dans le milieu. Dans ce but, la résistance de diverses souches de *Bacillus*, dont *Bacillus subtilis*, face à des niveaux variables de pH et de salinité doit être démontrée. (Shaheer et al., 2021). La résistance face à des variations de pH et de température peut être testée directement sur la bactérie mais peut l'être également sur les bactériocines produites par l'agent. (Banerjee et al., 2017). Ces tests sont nécessaires afin de s'assurer que le probiotique utilisé puisse survivre aux conditions du tractus digestif et, de ce fait, qu'il sera toujours actif. Une étude a démontré que *Bacillus* B29 pouvait croître à des valeurs de pH variant entre 2 et 9. La croissance n'était pas non plus altérée lors de la présence de 2% d'acides biliaires. (Nakharuthai et al., 2023)

## 2. Mécanismes d'action de *Bacillus subtilis* et démonstration *in vitro*

### 2.1. Peptides anti-microbiens

Une étude a permis de mettre en évidence l'impact de peptides antimicrobiens produits par *Bacillus subtilis* E20 provenant de farines de soja fermentées. L'évaluation des effets a été réalisée notamment par observation directe des cellules après le un temps d'incubation passé avec le peptide, mais également par observation de zones d'inhibition sur des cultures en gélose. Des évaluations microscopiques ont été réalisées notamment sur *Vibrio alginolyticus* et *Vibrio parahaemolyticus*. Les bactéries contrôles avaient une surface régulière et lisse, alors que les bactéries incubées avec les peptides antimicrobiens montraient des lésions et trous à leur surface. Cette modification ne fut observée que pour *Vibrio alginolyticus*. Cependant, une augmentation de la perméabilité membranaire fut tout de même observée pour les deux bactéries pathogènes. Ces peptides interagissent donc avec les membranes, les rendant plus fragile et parvenant même à former des pores chez certaines bactéries. Toutefois, les mécanismes précis de ces interactions ne sont à ce jour pas totalement élucidés. (Cheng et al., 2017). La même observation microscopique fut faite pour *Vibrio parahaemolyticus* après un traitement à la surfactine, lipopeptide produit par *Bacillus subtilis*. En effet, les bactéries apparaissaient déformées avec des contours irréguliers. Le cytoplasme apparaissait également modifié avec une diminution de la densité et de l'uniformité du contenu. (Zhou et al., 2025)

#### 2.1.1. Les bactériocines

Dans l'ensemble des substances produites par *Bacillus*, on retrouve les bactériocines. Il s'agit de peptides qui, comme leur nom l'indique, sont actifs contre les bactéries (Banerjee et al., 2017). Il s'agit de peptides anti-microbiens produits via une synthèse par les ribosomes (Abriouel et al., 2011).

#### 2.1.2. Les lantibiotiques

Les lantibiotiques sont des peptides faisant partie de la classe I des bactériocines (Riley and Wertz, 2002). Ils sont formés en partie par l'acide aminé lanthionine/méthylanthionine. La synthèse de ces peptides se fait par voie ribosomiale. La modification de ces précurseurs est réalisée de manière post-traductionnelle via la déshydratation des résidus L-thréonine et L-sérines, d'une part et par l'ajout de cystéine-thiol, d'autre part. La présence de ces acides

aminés permet une résistance accrue aux protéases, par la formation d'anneaux via des ponts sulfures. Ces lantibiotiques reprennent diverses molécules produites par des agents bactériens différents. Ces molécules sont classées selon deux groupes en fonction de de leur structure et de leur mode d'action pour lutter contre les micro-organismes (Riley and Wertz, 2002; Bierbaum and Sahl, 2009) :

- Les lantibiotiques de type A (figure 1), correspondant aux éléments capables de déstabiliser les membranes des bactéries via la formation de pores dans ces dernières. Parmi eux, on retrouve la subtiline et l'ericine A et S qui sont produites notamment par *Bacillus subtilis* (Stein, 2005). Leur structure est linéaire et ils sont chargés positivement (Abriouel et al., 2011);

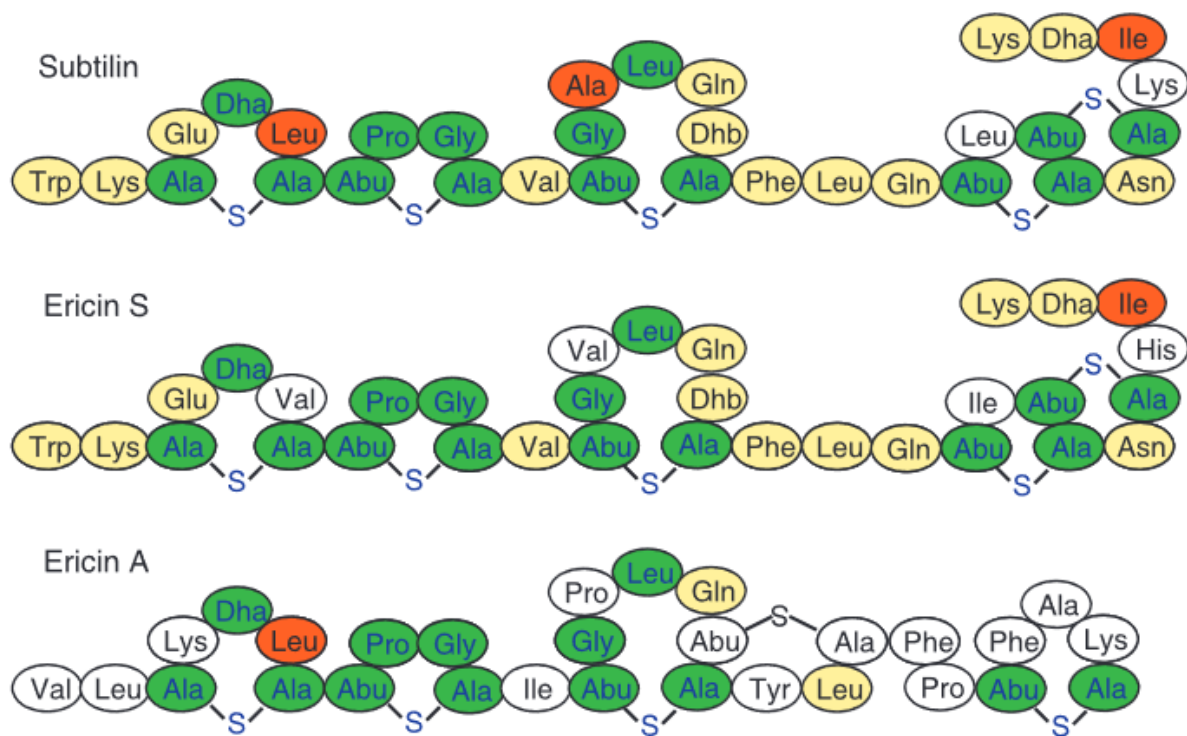


Figure 1 : représentation moléculaire de trois lantibiotiques de type A (Abriouel et al., 2011)

- Les lantibiotiques de type B, qui permettent d'inhiber certaines enzymes, notamment celles nécessaires à la formation des parois cellulaires. *Bacillus subtilis* produit de la sublancine 168 (figure 2). (Bierbaum and Sahl, 2009). La subtilosine A (figure 3), elle, est produite par la souche ATCC 6633 de *Bacillus subtilis*. Contrairement aux lantibiotiques de type A, ceux-ci sont de forme plus globulaire et sont non chargés (Abriouel et al., 2011).

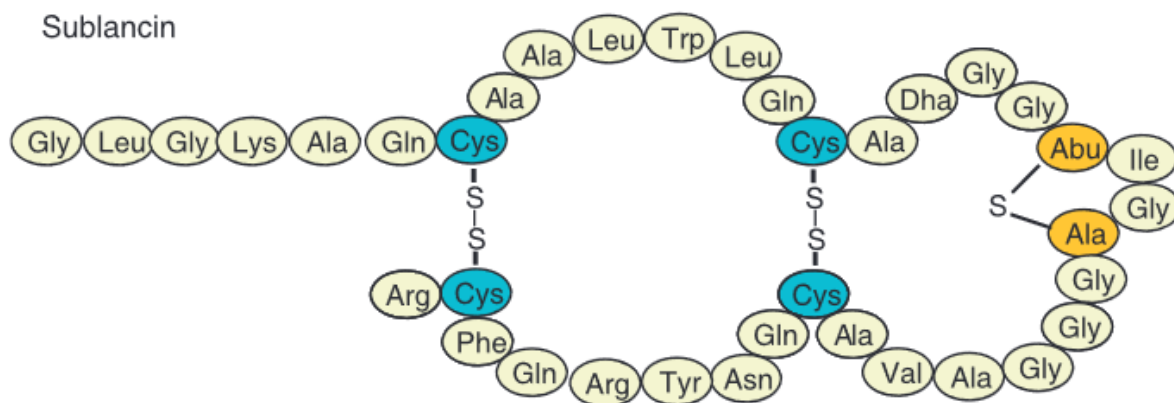


Figure 2 : représentation moléculaire de la sublancine (Abriouel et al., 2011)

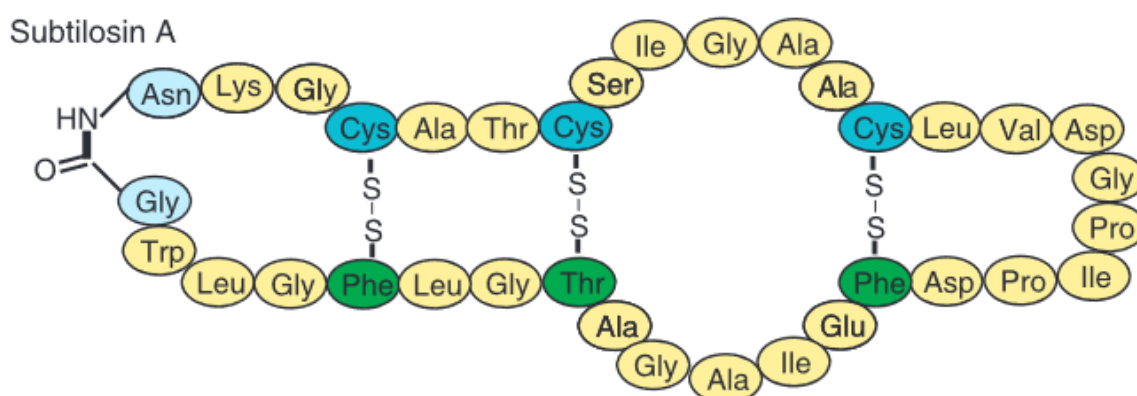


Figure 3 : représentation moléculaire de la subtilosine A (Abriouel et al., 2011)

Une étude menée sur *Bacillus subtilis* A1/3 et plus particulièrement sur sa capacité à synthétiser de l'éricine A et S, a montré la ressemblance entre l'éricine S et la subtiline au niveau de l'activité antibiotique, alors qu'au contraire l'éricine A ne montrait qu'une faible activité de ce type. L'effet antibiotique de ces deux peptides a été testé directement sur les espèces bactériennes suivantes : *Staphylococcus carnosus*, *Micrococcus luteus*, *Latilactobacillus sakei*, *Bacillus megaterium* et *Clavibacter michiganensis*. On pouvait observer une zone d'inhibition de la croissance des différents agents bactéries autour des puits contenant l'éricine S et la subtiline, alors que seule une très faible zone était visible autour de l'éricine A, et ce pour une seule de ces cinq bactéries. (Stein et al., 2002).

Dans ce même état d'esprit, l'activité inhibitrice face à diverses bactéries fut testée pour la sublancine, l'antibiotique produit par *Bacillus subtilis* 168. Les lantibiotiques ont généralement une action sur les bactéries Gram positives alors que les Gram négatives y sont résistantes. Aucune des bactéries Gram négatives testées n'a été inhibée par la présence du peptide. En ce

qui concerne les Gram positives, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* 6633, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes* ont montré une certaine sensibilité. *Bacillus cereus* a également été légèrement inhibé, bien que, au fur et à mesure de l'incubation, des colonies parvenaient tout de même à pousser au niveau du halo d'inhibition. Ceci est expliqué par le fait que l'inhibition des spores de *Bacillus cereus* n'est que temporaire, contrairement à la subtiline chez qui elle s'avère être définitive. Cela serait lié à la formule chimique de la sublancine, qui ne contient qu'un seul résidu déhydro, tandis que la subtiline en contient trois. (Kim et al., 2014)

### 2.1.3. Les lipopeptides

Les lipopeptides peuvent être soit linéaires soit cycliques. Ils font partie du groupe des peptides non ribosomiques. La protéine n'est pas construite via un modèle d'ADN mais via divers complexes enzymatiques. Des modifications suivant la synthèse peuvent être effectuées afin de donner lieu à la formation de lipopeptides différents (Iqbal et al., 2023). La surfactine (figure 4) est un des membres de cette famille. Cette molécule possède une tête polaire formée par la présence de deux acides aminés, l'acide glutamique et l'acide aspartique, chargés négativement à pH neutre. Elle possède également 5 autres acides aminés lipophiles à savoir leucine, valine et l'isomère D de la leucine. Ces cinq autres acides aminés ainsi que la présence d'un acide gras beta hydroxylé sont responsables de l'insertion de la surfactine au sein des membranes lipidiques. Le cycle lactone est formé grâce à la liaison ester existant entre l'acide glutamique et la chaîne hydrocarbonée. La présence à la fois de cette tête polaire ainsi que des acides aminés lipophiles et de la chaîne hydrocarbonée rendent cette molécule amphiphile (Deleu et al., 2013). Différents effets sont attribués à ce lipopeptide tels que l'impact sur la production de biofilms, la régulation de l'auto-inducteur responsable du quorum sensing ainsi que la dégradation

Elle contrecarre la formation des biofilms en empêchant la production des polysaccharides nécessaire à sa constitution. Parmi ces polysaccharides, on retrouve l'adhésine, synthétisée et exportée à partir du gène *icaADBC*. Il s'avère que la surfactine a un impact sur ce gène en diminuant son expression. Ce polysaccharide permet l'adhésion entre les cellules afin de pouvoir construire le biofilm. (Liu et al., 2019)

L'étude, menée par Petit et al., (2024) sur *Bacillus subtilis* C3, a démontré l'effet antimicrobien et anti biofilm de la surfactine sur *Vibrio harveyi*. *Bacillus subtilis* C3 a démontré une action plus préventive que curative en limitant la formation du biofilm de

*Vibrio harveyi*. En effet, différentes manipulations ont été réalisées afin de comprendre l'impact de cette souche de *Bacillus subtilis*. La mise en contact d'un biofilm de cette bactérie incubé pendant 24h avec l'agent pathogène a été réalisée afin de vérifier l'action préventive du probiotique. En guise de contrôle, les volumes de biofilms obtenus pour *Bacillus subtilis* C3 et *Vibrio harveyi* ont été mesurés de manière indépendante. Cette manipulation a permis de se rendre compte de la diminution significative du volume de biofilm de l'agent pathogène, après mise en contact avec le probiotique, en comparaison à sa culture seule. L'expérience inverse a ensuite été réalisée afin de comprendre l'impact de *Bacillus subtilis* C3 sur le biofilm formé depuis 24h par *Vibrio harveyi*. Dans ce cas de figure, *Bacillus subtilis* n'a pas pu agir sur le biofilm qui a pu continuer à croître. Afin d'attester que l'action sur le biofilm du pathogène était bien liée aux surfactines présentes dans le surnageant de culture cette souche de *Bacillus subtilis*, ce lipopeptide a été mis en contact de diverses manières avec le pathogène. Le volume de biofilm formé par *Vibrio harveyi*, incubé en même temps que l'ajout de surfactine, ne représentait que 17,62 +/- 12,51%, démontrant l'effet préventif. L'effet curatif de ce lipopeptide fut démontré, suite à l'ajout de la surfactine au niveau d'un biofilm formé pendant 24h, et pour lequel le volume était 20 fois moindre par rapport au contrôle. (Petit et al., 2024).

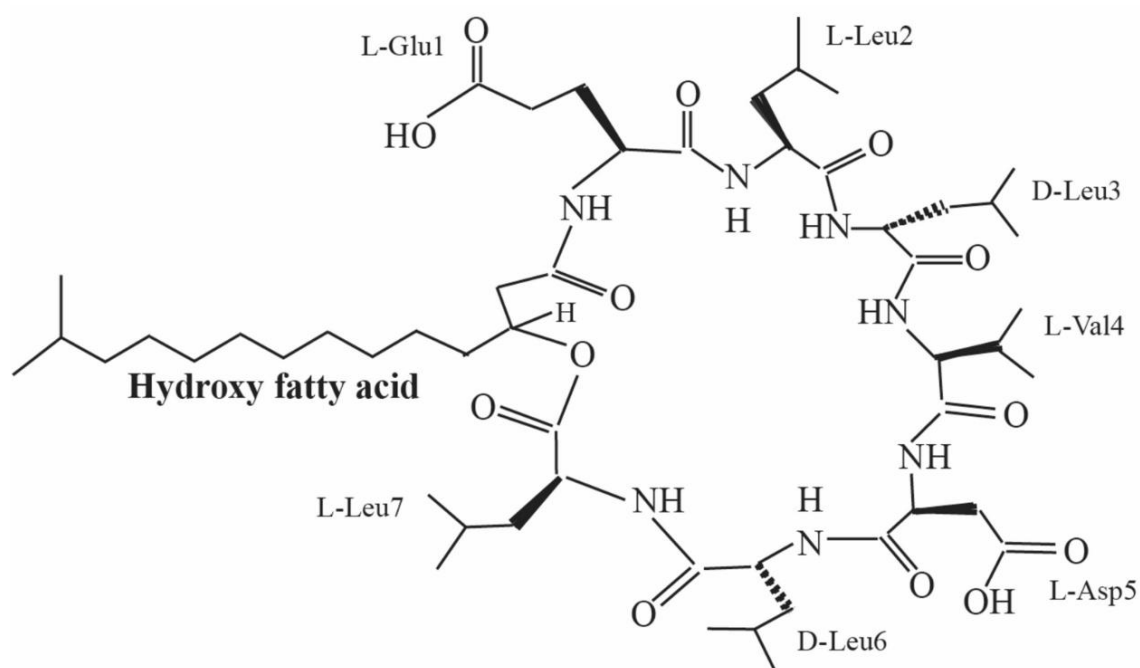


Figure 4 : Structure chimique de la surfactine (Chen et al., 2022)



Une autre étude visait à mettre en évidence l'impact de la surfactine sur *Vibrio parahaemolyticus*. L'effet inhibiteur de la surfactine a donc été étudié, de même que les changements qu'elle provoque au niveau des membranes, des gènes de virulence et du métabolisme de la bactérie. L'extraction de l'ARN des *Vibrio* et la réalisation d'une PCR quantitative en temps réel à différents moments de l'exposition à la surfactine a permis de déterminer s'il y avait bel et bien une modification de l'expression des gènes de virulence de *Vibrio*. Une comparaison a été réalisée avec un groupe contrôle de *Vibrio* non traité. Après seulement 1h d'exposition à la surfactine, l'effet inhibiteur était déjà bien visible. avec une diminution significative de l'expression de *pirA*, un gène de virulence, et également une diminution significative de la croissance bactérienne. Un gène particulier, *slyA*, régulant l'expression des gènes de virulence était fortement diminué suite à l'exposition à la surfactine. SlyA intervient également dans certaines voies métaboliques, notamment celle liée au soufre et aux glucides via la perturbation de la transcription de l'ADN (Zhou et al., 2025).

En ce qui concerne l'impact sur la membrane, au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en surfactine, l'hyperpolarisation de la membrane de *Vibrio* était de plus en plus marquée. Cette hyperpolarisation était mesurée via la présence d'un colorant fluorescent et la mesure de cette fluorescence. La même technique fut utilisée pour mesurer la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au sein des bactéries. Cette quantité s'accroissait d'autant plus que la quantité de surfactine était importante. La présence en grande quantité de ces ROS peut avoir un impact négatif sur les membranes cellulaires en provoquant la peroxydation des lipides qui les constituent. La culture de la bactérie avec différentes concentrations de surfactine et par la suite la centrifugation avec récolte du surnageant a permis de mesurer les concentrations en malondialdéhyde (MDA). Au même titre que pour les ROS, la valeur de MDA a augmenté avec l'élévation de la concentration en surfactine. Ceci est cohérent puisque la MDA est l'une des résultantes de la peroxydation des lipides et que, comme indiqué ci-dessus, l'augmentation de la quantité de ROS pourrait être à l'origine de cette réaction. (Zhou et al., 2025)

Une étude menée via un cheminement complexe comprenant diverses expérimentations a permis de mieux comprendre le fonctionnement d'un autre lipopeptide produit notamment par *Bacillus subtilis* dans le cas particulier de l'inhibition de la colonisation intestinale par *Staphylococcus aureus*. Cette étude a été menée afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels *Bacillus* permettait l'inhibition de *Staphylococcus aureus*. Elle fut menée chez l'Homme mais leur cheminement leur a permis de réellement comprendre les détails du mode

d'action des lipopeptides produits par *Bacillus*. Le lien entre le lipopeptide de type Fengycine et l'inhibition du gène *agr*, gène responsable de la détection de la densité cellulaire, a pu être démontré chez *Staphylococcus aureus*. Les preuves sont issues d'études menées chez l'Homme mais ce qui est intéressant ici c'est le mécanisme utilisé par ce lipopeptide.

Tout d'abord, des analyses de matières fécales récoltées sur un total de 200 personnes ont été réalisées afin de rechercher la présence de *Staphylococcus aureus* et celle de *Bacillus*. Il a été démontré que lors de la présence de *Bacillus* et principalement *Bacillus subtilis*, il y avait une absence de *S. aureus*. Une hypothèse a été émise par ces chercheurs : *Bacillus* serait capable de produire une molécule permettant l'inhibition de la communication entre les cellules ; elle fait suite à la découverte d'un facteur d'agglutination (ClfA) nécessaire pour la colonisation de l'intestin par *Staphylococcus aureus* et dont l'expression est régulée par le système visant à la détection de la densité de population de bactéries environnantes. Les signaux présents dans le « quorum sensing » varient d'une bactérie à l'autre. Les mécanismes visant à interférer avec ce système sont donc spécifiques, ce qui expliquerait la non-modification observée au niveau du microbiote. En effet, il n'existait aucune différence entre le microbiote des patients chez qui *Bacillus* avait été retrouvé dans les matières fécales et ceux chez lesquels *Staphylococcus aureus* avait été retrouvé. Cependant, il fut nécessaire de découvrir si le quorum sensing jouait un rôle au niveau de la colonisation intestinale par *Staphylococcus aureus*. Pour cela, deux populations de bactéries ont été utilisées. Des bactéries non mutées pour la protéine régulatrice Agr et des bactéries Agr-négatives. Cet effecteur intervient dans le quorum sensing. Il a pu être attesté que pour avoir une colonisation du milieu par la bactérie, la protéine Agr était nécessaire. Afin de vérifier si les lipopeptides produits par *Bacillus*, tels que la fengycine, étaient effectivement capables d'empêcher le fonctionnement d'Agr, les filtrats de culture de *Bacillus* retrouvés dans les matières fécales ont été utilisés. Le gène luxABCDE, responsable de la production de lumière, fut placé dans la partie du génome, de *Staphylococcus aureus*, contrôlée par Agr. Cette souche modifiée de *Staphylococcus aureus* fut mise en contact avec le substrat de culture de *Bacillus subtilis* afin d'attester de l'effet inhibiteur de *Bacillus subtilis* sur les facteurs de virulence dont l'expression est contrôlée par Agr. C'est l'absence de production de lumière qui en a permis de démontrer cet effet d'inhibition. Les analyses réalisées sur le « filtrat de culture de *Bacillus subtilis* » ont permis de mettre en évidence la présence de la fengycine. De manière à confirmer que ce lipopeptide était bien responsable de l'inhibition d'Agr, la production d'une souche mutante ne produisant pas de fengycine fut nécessaire. Les surfactines, elles, étaient toujours produites. Aucune

inhibition de Agr ne fut observée suite à la mise en contact avec le filtrat de culture de la bactérie mutante pour la fengycine. Cependant, concrètement, comment la fengycine permet-elle d'empêcher Agr de jouer son rôle ? Il s'avère que la structure de la fengycine est assez semblable au peptide auto-inducteur qui se lie à la partie extra-cellulaire du récepteur membranaire de la bactérie. Or, cela provoque une compétition entre cette substance inhibitrice et l'auto-inducteur, permettant l'activation des signaux intracellulaire visant à la lecture de gène de virulence (Piewngam et al., 2018).

La surfactine, mentionnée précédemment, intervient également dans l'inhibition du « quorum sensing ». Des observations ont été révélés que ce lipopeptide réprimait l'expression de l'auto-inducteur (AI-2) produit par *Staphylococcus aureus*. En effet, la surfactine régule à la baisse cette molécule. Or, cet auto-inducteur est responsable de l'expression d'un gène, *icaR*, permettant la régulation négative de la formation du biofilm via l'inactivation du gène *icaA*. La surfactine pourrait potentiellement activer ce gène *icaR* afin de réguler négativement le gène *icaA* permettant la création du biofilm (Liu et al., 2019)

Les recherches visant à la découverte de souches ayant ce type d'activité sont d'autant plus importantes au vu de la capacité de résistance des bactéries une fois qu'elles sont ancrées dans un biofilm, résistance notamment aux antibiotiques utilisés. Le recours aux antibiotiques ne permet alors pas l'élimination de l'ensemble des bactéries présentes. La découverte de composés capables de détruire les biofilms constituerait une alternative à l'utilisation d'antibiotiques. (Petit et al., 2024)

## 2.2. Le quorum quenching

Un autre mécanisme que possèdent les bactéries du genre *Bacillus* est le « quorum quenching », qui correspond à l'action d'empêcher le « quorum sensing », à savoir, un des moyens de communication inter bactéries. (Shaheer et al., 2021). Le « quorum quenching », qui induit donc la perturbation de la communication entre cellules, s'analyse donc comme un moyen pour certaines bactéries d'empêcher la virulence d'autres bactéries notamment des pathogènes. Les bactéries produisent des molécules appelées des auto-inducteurs, lesquels se retrouvent en plus ou moins grande quantité en fonction de la densité de bactéries. Une modification de l'expression de certains gènes est alors réalisée et le comportement de la bactérie se voit modifié (Waters and Bassler, 2005).

Le « quorum sensing » est donc un mécanisme entrant dans ce qu'on appelle les facteurs de virulence. Il contrôle divers éléments à savoir la formation de biofilms, la production de protéases ainsi que de métalloprotéases, de sidérophores, de toxines extra-cellulaires et des éléments du système de sécrétion de type 3. Un contrôle de l'expression de certains gènes s'effectue selon la densité de bactéries présentes. En fonction du pathogène, on observe des variations au niveau du mode de fonctionnement. *Vibrio harveyi* dispose de trois éléments différents permettant l'induction de ce mécanisme. Il s'agit donc de molécules de signalisation qui vont pouvoir interagir avec les autres bactéries en venant se fixer sur la paroi et permettre ainsi l'internalisation d'un message suite la liaison ligand-récepteur. Dans une étude où ont été prélevés des échantillons de sol d'étangs d'aquaculture et de mangrove, un grand nombre de bactéries pouvant former des spores ont été détectées. Parmi les 118 bactéries trouvées dans ces milieux, trois types de *Bacillus* ont montré le plus haut taux de dégradation du N-acétyl-homoserine lactones, à savoir une des molécules intervenant dans le « quorum sensing ». *Bacillus subtilis* faisait partie de ce trio de bactéries. La dégradation du AHL résulte de la production de la lactonase par la bactérie et provoquant l'hydrolyse de la partie lactone. Cependant, même après sa dégradation, lorsque l'acidité du milieu augmente, la AHL est capable de se reformer et récupérer ses propriétés. Comme mentionné précédemment, certains pathogènes, notamment *Vibrio harveyi*, sont capables de produire des enzymes. Dans le but de démontrer que certaines bactéries sont douées du « quorum quenching », il a fallu utiliser des substrats formés de molécules dégradables par les enzymes comme milieu de co-culture pour *Vibrio* et les différentes souches de *Bacillus*. (Shaheer et al., 2021).

### **3. Effets de l'efficacité de *Bacillus subtilis* in vivo sur le Tilapia du Nil.**

Différents travaux ont été réalisés sur le Tilapia du Nil afin d'étudier l'effet de diverses souches de *Bacillus subtilis* sur cette espèce. Pour cela, plusieurs facettes ont été investiguées, à savoir, l'effet sur la croissance, la digestion, l'activité enzymatique au niveau digestif, la qualité de l'eau, l'immunité, la tolérance au stress et la résistance à divers pathogènes. Les informations principales concernant les études utilisées dans ce chapitre sont reprises dans l'annexe 1.

### 3.1. Sur l'immunité

#### 3.1.1. Détection des agents bactériens par l'hôte

Afin de pouvoir augmenter l'immunité de son hôte, il faut que *Bacillus subtilis* soit détecté par le système immunitaire de l'hôte. Certains membres de la famille des récepteurs de type Toll (TLR) sont capables de détecter les « pathogen-associated molecular pattern » portés par les bactéries. Ces récepteurs sont composés de trois éléments localisés à diverses positions au niveau de la membrane : la partie extracellulaire avec une extrémité N et un domaine composé de plusieurs répétitions de leucine, la partie transmembranaire et la portion intra cellulaire avec le récepteur TOLL/IL-1. Cette dernière portion n'est pratiquement pas modifiée entre les différents récepteurs Toll. Tous les types de TLR ne permettent pas la détection de bactéries. Chez le Tilapia du Nil, on retrouve le TLR25 qui serait étroitement lié aux TLR 1 et TLR 2. En effet, le TLR25 possède la même structure au niveau de la répétition des leucines mais la différence avec le TLR1 se situe au niveau de la partie N terminale. Ces récepteurs s'avèrent être des capteurs de bactéries. C'est grâce à la compréhension de ces voies de signalisation et de la connaissance de l'association ligand-récepteur pour chaque TLR que l'on pourra comprendre comment pouvoir influencer les réponses immunitaires via notamment l'utilisation des probiotiques. Les bactéries Gram positives, dont *Bacillus subtilis* fait partie, contiennent dans leur paroi des peptidoglycanes qui sont reconnus par les TLR2. Les lipopeptides également produits par *Bacillus subtilis* sont reconnus soit par les hétérodimères TLR2-TLR1 ou TLR2-TLR6 suivant qu'ils sont triacylés ou diacylés. Au vu de l'étroitesse de formule entre le TLR1 et 25 comme mentionnée ci-dessus, le TLR25 pourrait potentiellement s'associer au TLR2 afin de pouvoir détecter une variété plus importante de PAMPs. L'activation de ces TLR entraîne la mise en place d'une cascade de signalisation permettant, in fine, de produire des cytokines inflammatoires (Zhang et al., 2014).

#### 3.1.2. Le lysozyme de type C et mécanismes d'autoprotection de *Bacillus subtilis*

Les différentes études permettent de constater que *Bacillus subtilis* est responsable de l'accroissement de l'expression du lysozyme de type C chez l'hôte. Le lysozyme de type C est une enzyme antimicrobienne qui fait partie de l'immunité innée. Sa production est stimulée suite à la présence de bactéries, de lipopolysaccharides ou encore de peptidoglycanes. Cette enzyme induit la mort des bactéries en solubilisant leur paroi suite à la dégradation des polysaccharides et peptidoglycanes qui y sont présents. Le lysozyme peut donc facilement

atteindre les bactéries Gram positives. En ce qui concerne les bactéries Gram négatives qui possèdent une membrane externe composée de lipopolysaccharides, le lysozyme n'a pas un accès direct à la paroi. D'autres éléments du système immunitaire inné sont donc nécessaires pour provoquer la lyse de la membrane externe. Les bactéries ne sont pas les seuls organismes visés : les virus, les champignons et parasites peuvent également être atteints. (Song et al., 2021)

Il est donc légitime de se demander comment *Bacillus* fait pour se protéger de cette enzyme capable d'altérer les parois des bactéries, d'autant plus au vu de la nature de *Bacillus*, une bactérie de type Gram positif.

Il s'avère que *Bacillus subtilis* possède des mécanismes de protection via l'intervention d'un régulon nommé  $\sigma^v$ , produit en réponse à la présence de lysozyme.  $\sigma^v$  est à l'origine de la modification des peptidoglycanes composant la paroi, les rendant ainsi moins accessibles aux lysozymes.  $\sigma^v$  régule l'expression de gènes codants pour deux enzymes à savoir OatA et DltABCDE. OatA permet l'acétylation des peptidoglycanes et DltABCDE permet l'insertion de résidus D-alanine au sein des acides téichoïques. Ces deux altérations empêchent l'attraction et le clivage de la paroi par le lysozyme (Guariglia-Oropeza and Helmann, 2011).

En ce qui concerne l'immunité, un grand nombre de paramètres peuvent être mesurés afin de pouvoir attester que cette dernière soit bien améliorée par la présence du probiotique que l'on souhaite tester.

La superoxyde dismutase et le myéloperoxydase sont deux enzymes permettant le traitement des espèces réactives de l'oxygène. (Won et al., 2020). La production d'espèces réactives de l'oxygène, telles que  $O_2^-$  et  $H_2O_2$ , est initiée par les cellules phagocytaires afin de permettre la destruction des pathogènes. Cela fait partie intégrante de l'immunité innée et leur augmentation démontre un organisme étant prêt à combattre les envahisseurs (Liu et al., 2017; Galagarza et al., 2018). Lors d'une supplémentation en *Bacillus subtilis* dans l'alimentation à un taux de  $1 \times 10^8$  CFU/g, il semble que les taux d'activité de ces enzymes soient accrus de manière significative (Won et al., 2020).

Une autre manipulation, visant à démontrer l'activité bactéricide du sérum, peut-être accomplie. Il est pour cela nécessaire de prélever le sérum et de l'incuber avec une suspension bactérienne. Le dénombrement des bactéries viables après cette incubation permettra d'attester de cette activité bactéricide ou non. Dans ce cas-ci, les valeurs obtenues étaient significativement supérieures pour les animaux ayant reçu dans leur alimentation des

probiotiques, et ce pour les trois espèces bactériennes visées dans cette étude à savoir : *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas syringae* (Aly et al., 2008).

Les composants de l'immunité innée ont été significativement stimulés par l'administration de *Bacillus subtilis* DSM 32315. Parmi ces composants, on retrouve le lysozyme, le complément C3.

Dans l'étude de Liao et al, (2023), deux problématiques ont été étudiées afin de comprendre l'impact de *Bacillus subtilis* dans différentes conditions. Les auteurs y ont testé des aliments contenant deux pourcentages différents de protéines (28% et 32%). Un challenge test a été effectué, cette fois ci non pas en utilisant un micro-organisme mais en jouant sur la concentration en ammonium dans l'eau. La découverte fut que, quelles que soient les conditions de concentration en ammonium dans l'eau, l'utilisation du probiotique permettait de diminuer la valeur de la malondialdéhyde, une molécule permettant d'indiquer le niveau de stress oxydatif. Une constatation intéressante fut que les meilleurs résultats concernant l'amélioration de l'immunité étaient obtenus pour l'aliment à 28% de protéines avec 0,1% de *Bacillus subtilis* et pour l'aliment à 32% avec 0,3% de *Bacillus subtilis*. (Liao et al., 2023)

*Bacillus subtilis* est une bactérie douée de la capacité de sporuler. Sachant cela, des chercheurs ont décidé de mener une étude en utilisant des spores de deux souches différentes. Avant le démarrage de l'étude visant à montrer l'effet sur le Tilapia de l'utilisation de spores de deux souches de *Bacillus subtilis*, les chercheurs ont recherché ces souches au sein même du tube digestif des poissons. Aucune des deux souches n'a pu être détectée. Les mesures de quantification du lysozyme, une enzyme dont les bienfaits ont été mentionnés ci-dessus, ont été réalisées à plusieurs reprises au cours de l'étude, permettant de montrer une augmentation significative de cette enzyme mais avec des degrés variables. L'impact des souches NZ86 et O14VRQ de *Bacillus subtilis* a été montré comme étant significatif en ce qui concerne l'expression de cytokines pro-inflammatoires (permettent une régulation positive des réponses inflammatoire ainsi que de stimuler l'arrivée de phagocytes au niveau de l'intestin), l'activité phagocytaire des leucocytes, l'activité du lysozyme ou encore la voie alternative du complément. La souche O14VRQ a cependant montré une meilleure stimulation sauf pour la voie alternative du complément où c'était la souche NZ86 qui a permis la meilleure réponse (Galagarza et al., 2018). Des résultats tout aussi encourageants ont été obtenus par Aly et al., (2008) à la suite de l'utilisation de la souche ATCC 6633, des mesures de l'activité du lysozyme ont été effectuées à un et deux mois après le début du traitement. Des valeurs significativement supérieures ont été enregistrées pour les groupes supplémentés en

probiotiques et ce par rapport au groupe contrôle. Il n'y avait cependant pas de réelle différence entre les valeurs obtenues à un et deux mois.

### 3.2. Résistance au stress et aux pathogènes

Il semble que toutes les souches de *Bacillus subtilis* ne permettent pas une protection absolue contre tous les pathogènes. Le taux de survie des individus étudiés et challengés par *Streptococcus agalactiae* fut comparable, qu'ils aient été supplémentés ou non en *Bacillus subtilis*. Il est à noter que *Bacillus cereus* semble avoir eu un impact plus important au niveau de la démonstration d'une réponse immunitaire innée que *Bacillus subtilis*. Il en va de même pour les animaux supplémentés avec le mélange des deux espèces de *Bacillus* (Xia et al., 2020). Une seconde étude étudiant le même pathogène mais avec cette fois-ci *Bacillus subtilis* HAINUP40 a montré des résultats très différents. Cette souche bactérienne a démontré sa capacité à accroître le taux de survie des poissons face à *Streptococcus agalactiae*, en passant de 15% pour les poissons non traités à 60% pour ceux supplémentés (Liu et al., 2017). Une autre valeur intéressante est celle du RLP, qui est « le taux relatif de protection ». La détermination de cette valeur est basée sur la formule «  $1 - (\text{le pourcentage de mortalité dans le groupe traité} / \text{le pourcentage de mortalité dans le groupe contrôle}) \times 100$  » dans laquelle les taux de mortalité dans le groupe contrôle et dans le groupe traité sont requises. Cette donnée était significativement plus élevée pour le groupe traité en comparaison au groupe contrôle, indiquant une protection accrue conférée par l'ingestion de probiotiques (Aly et al., 2008). Concernant *Aeromonas hydrophila*, on a pu voir que la supplémentation en *Bacillus subtilis* WB60 a permis de fournir aux individus une meilleure résistance face à ce pathogène. Il est intéressant de noter que la quantité de probiotique ajoutée à l'alimentation a joué un rôle important dans les effets observés. En effet, le taux de survie lors de l'inoculation avec *Aeromonas hydrophila* ainsi que l'activité de la superoxyde dismutase et de la myéloperoxydase ont été considérablement augmentés par l'utilisation  $1 \times 10^8$  CFU/g plutôt que de  $1 \times 10^7$  CFU/g. L'expression d'autres éléments a également été stimulée par cette concentration en probiotique. Il s'agit de HSP70, du TNF alpha, de l'IL-1 $\beta$  et de l'IFN- $\gamma$  (Won et al., 2020). Enfin, une autre étude a décidé d'investiguer l'impact de *Bacillus subtilis* QST713, en comparaison avec l'impact suivant l'administration de triméthoprim-sulfaméthoxazole, sur le taux de survie après inoculation de *Vibrio cholerae*. Le taux de survie était significativement accru suite à l'administration de ces éléments en comparaison au groupe contrôle. Cependant, le taux était légèrement plus important dans le groupe supplémenté en *Bacillus subtilis* avec une valeur d'environ 90% contre 80% pour le groupe



traité à l'antibiotique. Au vu de ces résultats, l'usage du probiotique semble être tout aussi performant que l'usage d'antibiotique, afin d'accroître le taux de survie face à ce pathogène (Elewasy et al., 2024).

Un élément intéressant fut par ailleurs relevé, à savoir que lors de tests réalisés à partir de certains pathogènes, l'inoculation est pratiquée par injection intra-péritonéale. Toutefois, cela signifie que l'on contourne le tractus digestif et que l'on ne tient dès lors pas compte de la compétition qui peut régner entre le pathogène et le probiotique au sein de ce milieu. Il est donc assez probable que les résultats obtenus au niveau du taux de survie puissent être améliorés si l'individu infecté pouvait bénéficier de cet effet de compétition (Addo et al., 2017).

La réalisation de tests *in vitro* et *in vivo* du probiotique face à divers pathogènes permet de pouvoir comparer différents résultats obtenus. L'utilisation d'un probiotique peut s'avérer fructueuse pour contrer un pathogène *in vitro* et au contraire ne pas l'être dans des conditions *in vivo*. Dans l'étude de Aly et al., (2008), des tests *in vitro* ont été réalisés à l'aide de *Lactobacillus acidophilus* et *Bacillus subtilis* pour identifier ou non un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries suivantes : *Streptococcus iniae*, *Aeromonas hydrophila* et *Pseudomonas fluorescens*. Les résultats obtenus concernant *Bacillus subtilis* sont qu'il a permis une inhibition d'*Aeromonas hydrophila* et de *Pseudomonas fluorescens* mais pas de *Streptococcus iniae*. La sécurité du probiotique en question est également importante. C'est pour cela que son injection intra-péritonéale est réalisée avec, en tant que groupe contrôle, des animaux ayant reçu une injection intra-péritonéale de solution saline stérile. Pour cette étude, aucune mortalité n'a été enregistrée sur une période de 15 jours suivant l'injection (Aly et al., 2008)

Certains chercheurs décident de ne pas réaliser un challenge test sur base d'un agent pathogène mais plutôt sur base des conditions d'élevage. Dans le cadre de l'étude de Telli et al.,(2014), le choix s'est porté sur la densité de population. L'élevage s'est fait à deux niveaux de densité (à 18,75 poissons m<sup>-3</sup> et 62,50 poissons m<sup>-3</sup>). La conclusion de l'étude est que l'utilisation de probiotiques a permis, dans des conditions de haute densité, d'améliorer les paramètres de l'immunité innée. Cependant, lorsqu'on observe les valeurs obtenues pour le lysozyme en conditions de basse densité, qu'il s'agisse du groupe contrôle ou du groupe supplémenté en *Bacillus subtilis*, les valeurs sont les mêmes. Effectivement, entre le groupe contrôle et le groupe supplémenté à haute densité, il y a une différence importante entre les valeurs, mais peut-on réellement attribuer cette stimulation de l'immunité innée à l'utilisation

de *Bacillus subtilis* ? On peut également imaginer que la présence de *Bacillus subtilis* a permis de contrer les effets négatifs du stress dans les conditions de densité de population élevée en améliorant les éléments de l'immunité innée. Cela suggère donc que l'utilisation bénéfique des probiotiques n'intervient pas uniquement dans la prévention et la résistance aux pathogènes mais également dans des conditions d'élevages pouvant amener un certain stress comme dans le cas présent avec une forte densité. (Telli et al., 2014).

### 3.3. Conservation

Pour assurer une consommation suffisante du probiotique en question par les poissons, il est nécessaire de s'intéresser aux conditions de conservation nécessaires pour disposer d'un nombre suffisamment important de cellules viables. Des analyses sur des aliments conservés à deux températures différentes ont été réalisées et ont permis d'établir qu'une conservation de l'aliment à 4°C plutôt qu'à 25°C favorisait la présence d'un plus grand nombre de bactéries compétentes (Aly et al., 2008).

### 3.4. Viabilité et persistance après ingestion

Il est également judicieux de s'interroger sur la quantité de probiotique viables se trouvant dans l'intestin après l'administration d'une dose connue du probiotique en question, dans le cas présent  $10^8$  CFU/g d'aliment. Au total, trois mesures ont été réalisées, à 2, 4 et 8 semaines post-ingestion, avec des valeurs de *Bacillus subtilis* dans l'intestin de respectivement  $1,02 \times 10^7$  CFU/g,  $1,07 \times 10^7$  CFU/g et  $1,89 \times 10^7$  CFU/g. (Liu et al., 2017). Ces résultats montrent que la dose retrouvée dans l'intestin est inférieure à celle administrée. Cependant celle-ci tend à rester stable au fil du temps, voir même à augmenter légèrement. Cela pourrait suggérer une adaptation du microbiote avec une meilleure colonisation par *Bacillus subtilis* au cours du temps.

### 3.5. Modalités d'administration

La manière d'instiller le probiotique est également intéressante à étudier. La plupart des études choisissent de coater ou mélanger le probiotique directement à l'aliment. Dans le cas de l'étude de Zhou et al., (2010), le probiotique est directement disposé dans l'eau tel quel. Il aurait été utile de comparer l'utilisation de cette souche d'une part en l'appliquant directement à l'eau et d'autre part à l'ajoutant à la formation de l'aliment. La comparaison avec d'autres probiotiques peut permettre de repérer l'efficacité de certains probiotiques pour des effets particuliers par rapport à d'autres. Toujours dans cette même étude, trois probiotiques

différents ont été utilisés : *Bacillus subtilis* B10, *Bacillus coagulans* B16 et *Rhodopseudomonas palustris* G06. L'effet positif de *Bacillus subtilis* B10 sur la SOD, la CAT et la production d'espèces réactives de l'oxygène a pu être démontré. Cependant, les valeurs obtenues à partir de *Bacillus coagulans* étaient plus importantes. (Zhou et al., 2010)

### 3.6. Impacts de la durée d'administration

La durée d'administration nécessaire pour montrer des effets notamment concernant l'immunité est importante à connaître afin d'effectuer, par la suite, une mise en application qui soit adéquate. L'étude de Liu et al., (2017) a permis d'observer que l'activité du lysozyme et la production d'espèces réactives de l'oxygène avaient été considérablement augmentées après 2 semaines de supplémentation en probiotique, mais que, par la suite, entre les mesures réalisées après 4 et 8 semaines, les différences n'étaient plus significatives. L'inverse fut constaté pour la « capacité anti-oxydante totale » (T-AOC) et l'activité de la superoxyde dismutase, avec des valeurs significativement augmentées seulement après 8 semaines (Aly et al., 2008). Le T-AOC permet de rassembler l'ensemble des moyens antioxydants du corps en une seule valeur (Liu et al., 2017). Cela démontre donc que pour certains paramètres, un temps d'exposition au probiotique plus long semble nécessaire pour permettre l'acquisition d'une bonne immunité. La durée d'administration du probiotique semble aussi avoir un impact sur le niveau de protection. En effet, ce taux s'est avéré largement plus élevé après deux mois d'ingestion de la souche de *Bacillus subtilis* ATCC6633 en comparaison à ce qui était observé après seulement 1 mois et ce suite au challenge test réalisé pour *Streptococcus iniae*, *Aeromonas hydrophile* et *Pseudomonas fluorescens*. (Aly et al., 2008).

### 3.7. Association de probiotiques

Certains groupes de recherche ont pris le parti de tester des espèces de bactéries différentes, de manière individuelle mais également en association. C'est le cas pour Aly et al., (2008) qui ont utilisé de manière isolée et combinée *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Lactobacillus acidophilus*. Il est intéressant de noter que l'association de *Bacillus subtilis* et de *Lactobacillus acidophilus* a permis un taux de survie significativement plus important que *Bacillus subtilis* seule face aux pathogènes étudiés. Il existe potentiellement une synergie entre ces deux bactéries. La même observation a été mise en évidence pour l'activité bactéricide du sérum. (Aly et al., 2008). Addo et al., (2017), ont étudié trois souches (SB3086, SB3295 et SB3615) et ont décidé de combiner deux d'entre elles (SB3086 et SB3615). Il semble que les souches de *Bacillus subtilis* étudiées ici permettent une stimulation accrue de l'immunité innée

systémique via l'activité du lysozyme et l'activité bactéricide du sérum. Il ne semble cependant pas y avoir de réelle différence entre le fait d'utiliser une de ces souches ou d'en combiner deux en ce qui concerne la résistance face à *Streptococcus iniae*, l'activité du lysozyme ou encore l'activité bactéricide du sérum.

## 4. Discussion

*Bacillus subtilis* semble pouvoir être considéré comme une bactérie intéressante en tant que probiotique pour l'aquaculture. Il est en effet déterminé comme sûr par l'absence de gènes de résistance aux antibiotiques ou encore de facteurs de virulence. (Olmos et al., 2020). Il produit toute une série de facteurs antimicrobiens permettant la dégradation et l'inhibition de pathogènes. (Petit et al., 2024). De nombreux effets sont observés suite à leur utilisation, et ce, notamment chez le Tilapia du Nil. En effet, concernant l'aspect de la croissance, après une supplémentation durant 8 semaines de *Bacillus subtilis* HAINUP40, une augmentation significative du poids final des poissons ainsi qu'une diminution du taux de conversion alimentaires ont pu être observés. La production d'enzymes digestives s'est également vue être impactée positivement avec une augmentation significative de la production d'amylase et de protéase après cette supplémentation. Les effets ne se trouvent donc pas être uniquement présent au niveau immunitaire mais bien sûr d'autres plans de l'élevage. (Liu et al., 2017) Cependant, concernant les différents effets étudiés, tous les articles ne sont pas unanimes quant aux éléments observés. Comme mentionné précédemment, la supplémentation en *Bacillus subtilis* HAINUP40 a permis un gain de poids plus important en comparaison au groupe contrôle non supplémenté alors que l'administration de *Bacillus subtilis* B10 n'a pas montré cet effet (Zhou et al., 2010; Liu et al., 2017). De même pour « la capacité antioxydante totale » pour laquelle aucune différence significative n'a été observée après l'administration de *Bacillus subtilis* B10 contrairement à *Bacillus subtilis* DSM32315 (Zhou et al., 2010; Liao et al., 2023)

Il faut toutefois rester critique par rapport aux études menées avant de conclure que les effets de *Bacillus subtilis* ne semblent pas prometteurs ou semblent inconstants. En effet, les différentes études menées traitent de souches de *Bacillus subtilis* différentes. Cela permet de se rendre compte de la diversité de souches existantes et que toutes n'ont pas le même potentiel d'efficacité. Par ailleurs, les conditions dans lesquelles les études sont menées ne sont pas toujours identiques avec des systèmes de maintien de la qualité de l'eau, des densités de populations différentes. Par exemple, dans certains cas 20 poissons par cuve de 300l avec

un système d'aquaculture en recirculation (RAS) ou dans d'autres cas, 60 poissons par cuve de 50l (Galagarza et al., 2018; Xia et al., 2020). La distribution du probiotique s'est faite la plupart du temps par fixation sur les pellets d'aliments mais une étude a cependant décidé de directement appliquer ce dernier dans l'eau. Les dosages et temps d'administration n'étaient pas toujours identiques. Si on reprend l'exemple ci-dessus, *Bacillus HAINUP 40* avait été administré à une dose de  $1 \times 10^8$  CFU/g pendant 8 semaines via l'alimentation alors que *Bacillus subtilis B10* fut administré directement dans l'eau à une dose de  $1 \times 10^7$  CFU/ml pendant seulement 40 jours (Zhou et al., 2010; Liu et al., 2017). Tous ces éléments font qu'il est normal d'observer des différences entre ces études.

Bien que de nombreuses études soient menées dans ce domaine, il est intéressant de s'intéresser à la réelle utilisation des probiotiques en élevage et leur connaissance auprès des pisciculteurs. Une enquête a été réalisée dans le cadre de ce travail auprès de 40 pisciculteurs wallons en vue de percevoir l'intérêt perçus de ces probiotiques et de manière plus globale certains éléments de l'aquaculture. Au total, sept soit 17,5% des entreprises interrogées ont répondu au questionnaire soumis.

Le problème principal en aquaculture et revenu le plus fréquemment dans les réponses est l'atteinte des poissons par des maladies (85,7% des éleveurs ont choisi cette proposition). D'autres éleveurs ont choisi également le coût élevé de l'alimentation, la mauvaise qualité de l'eau, ainsi que la prédation (figure 5).

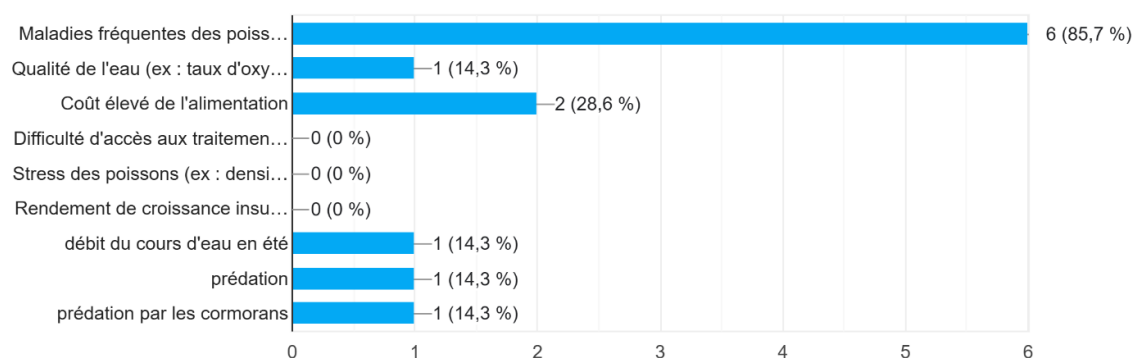


Figure 5 : identification des principaux problèmes rencontrés dans l'élevage aquacole.

Il était intéressant également de se renseigner sur les moyens utilisés actuellement afin de lutter contre les problèmes mentionnés ci-dessus. Les éléments suivants ont été mentionnés : antiparasitaires, balnéation, antibiotiques, contrôle de la provenance des poissons, chaulage

des étangs, stamping out. Concernant de manière plus spécifique la question des probiotiques, 57,1% des répondants connaissent l'usage des probiotiques en aquaculture (figure 6).

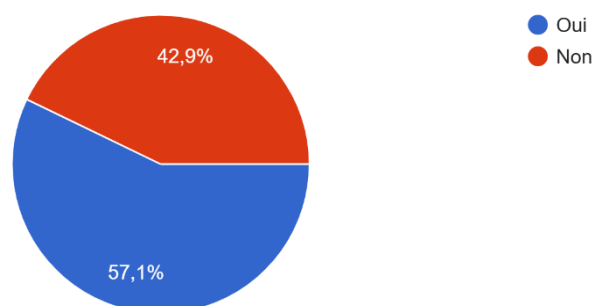


Figure 6 : Connaissance oui ou non de l'usage des probiotiques en aquaculture.

Cependant, aucun d'entre eux ne les utilise. Une personne a d'ailleurs répondu qu'elle ne savait pas réellement si elle en utilisait ou non, ignorant si les aliments utilisés en contenaient ou non.

Pour le reste, les raisons mentionnées pour expliquer l'absence d'utilisation de ces probiotiques ont été les suivantes (figure 7) :

- manque d'information sur leur utilité ;
- manque de fournisseurs ;
- les probiotiques sont à incorporer dans les aliments après l'achat de ces derniers ;
- ils ne semblent pas nécessaires ;
- les produits existants sont peu connus.

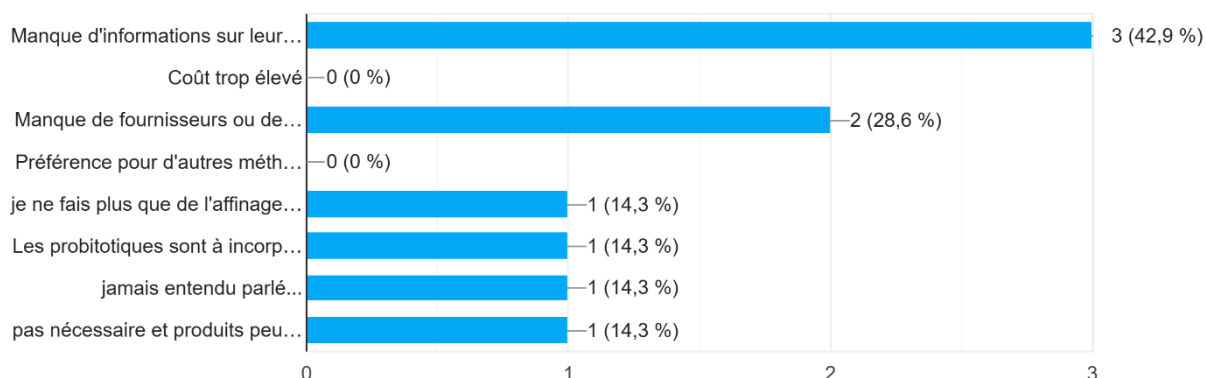


Figure 7 : Quelles sont les raisons de la non-utilisation des probiotiques.

Plus de quarante pourcents des répondants jugent comme étant moyen l'intérêt des probiotiques (figure 8)

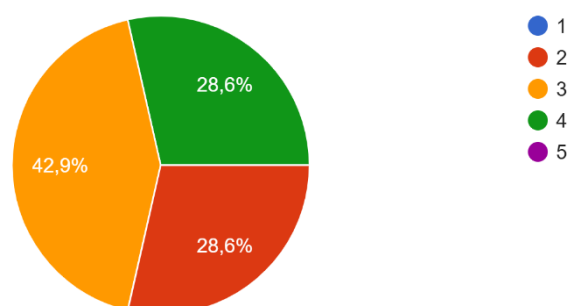


Figure 8 : Evaluation de l'intérêt potentiel de l'usage des probiotiques en aquaculture (1 = aucun intérêt, 5 = très intéressant)

Il fut intéressant de voir ce qui encouragerait les pisciculteurs à compléter leurs poissons en probiotiques ainsi que leurs attentes. Le bénéfice principal attendu de leur part serait la réduction des pathologies (figure 9). Afin de pouvoir juger de l'utilité des probiotiques leur souhait serait d'avoir plus d'informations scientifiques quant à leur réelle efficacité, avoir des retours d'expérience d'autres pisciculteurs en ayant déjà l'usage, ainsi que des formations et un accompagnement technique (figure 10).

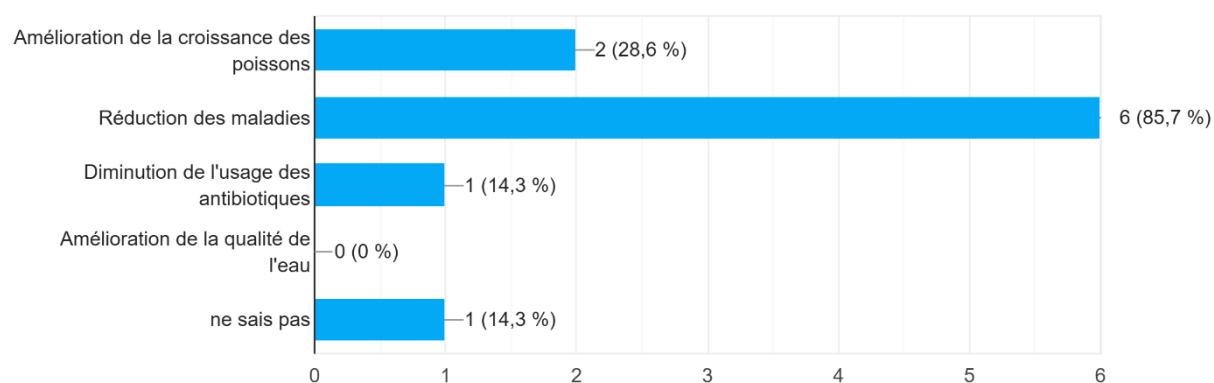


Figure 9 : Quels sont les bénéfices attendus par les éleveurs de l'utilisation des probiotiques.

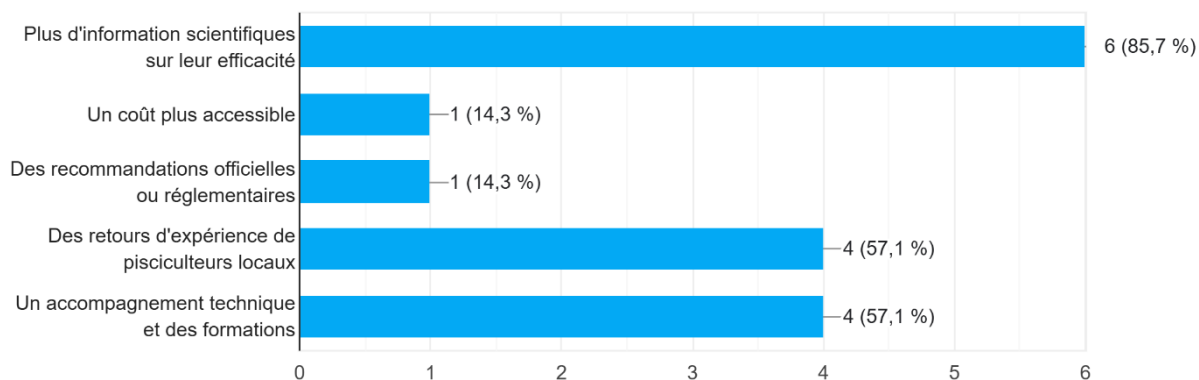


Figure 10 : Quels sont les éléments qui encourageraient les éleveurs à utiliser les probiotiques.

La majorité des répondants seraient intéressés par une formation traitant de ce sujet (figure 11).

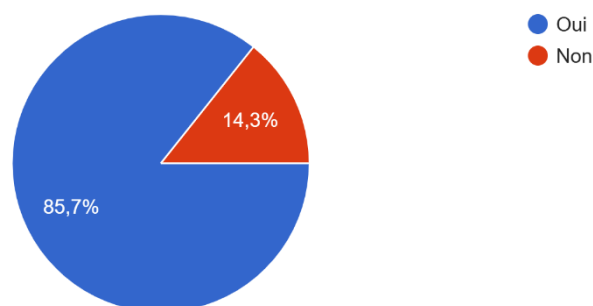


Figure 11 : Intérêt porté par les éleveurs concernant le fait de recevoir une présentation ou une formation sur l'usage des probiotiques en aquaculture.

On note donc : chez une notable majorité de ces répondants, un intérêt de disposer de meilleures connaissances de ces probiotiques ;

- que peu de moyens semblent être mis en œuvre à l'heure actuelle pour dépasser l'usage d'antibiotiques et antiparasitaires, par manque de connaissance et de disponibilité des probiotiques.

Il faut toutefois prendre ces réponses avec des pincettes. Le nombre et la qualité des réponses est assez peu représentatif. La démarche visait à avoir une connaissance de ce qui est pratiqué à une échelle locale. Le même type d'enquête pourrait être réalisé afin de comprendre les



réelles attentes des pisciculteurs et les éléments qu'ils souhaiteraient qu'on leur fournisse afin de pouvoir en faire usage.

Le but du travail ici présent était de comprendre les mécanismes permettant à *Bacillus subtilis* de jouer son rôle antimicrobien et d'évaluer les effets de son application sur une espèce précise de poissons. Cependant, l'utilisation de plusieurs probiotiques a également été étudiée afin d'y voir une potentielle synergie entre diverses espèces bactériennes. L'association de *Bacillus subtilis* et *Lactobacillus acidophilus* fut étudiée, après une supplémentation individuelle et combinée de ces deux bactéries, chez le Tilapia du Nil. Leurs résultats indiquent que l'utilisation combinée de ces deux bactéries a permis une meilleure activité bactéricide du sérum ainsi qu'un meilleur taux de survie face à divers pathogènes contrairement à leur administration individuelle. (Aly et al., 2008)

Néanmoins, malgré la démonstration des effets positifs de *Bacillus subtilis*, les mécanismes précis ne sont que partiellement expliqués. Certaines études menées chez l'Homme ont permis de comprendre le rôle d'une variété de lipopeptides produit par *Bacillus subtilis*, à savoir, la fengycine. L'activation des récepteurs de type Toll via certains composés présents dans la structure de *Bacillus subtilis* permettrait l'activation d'une cascade de signalisation avec la production, in fine, de cytokines pro-inflammatoires (Zhang et al., 2014). Des recherches semblables pourraient faire l'objet d'études chez les poissons afin d'attester que le même mécanisme y est présent pour des pathogènes spécifiques de ces organismes.

## 5. Conclusion

Au vu du développement croissant de l'aquaculture et de la nécessité de trouver des alternatives aux antibiotiques, les probiotiques semblent être un choix judicieux. Le recours aux probiotiques, notamment constitués de *Bacillus subtilis*, représente une stratégie prometteuse. En effet, Ils permettent d'améliorer l'immunité, la résistance à divers pathogènes tels que *Streptococcus iniae*, diverses espèces de *Vibrio*, ainsi qu'*Aeromonas hydrophila*, chez Le Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*). De nombreuses études ont été menées afin de mettre en évidence les nombreux bienfaits de ces probiotiques. Le Tilapia du Nil est une espèce clé en ce qui concerne la production aquacole mondiale.

Ce travail permet de souligner l'intérêt de l'utilisation de *Bacillus subtilis* afin de renforcer l'immunité chez le Tilapia, accroître son taux de survie face à certain pathogènes, ainsi que

d'accroître sa résistance dans certaines conditions telles qu'une densité de population importante.

## 6. Bibliographie

Abriouel, H., Franz, C.M.A.P., Omar, N.B., Gálvez, A., 2011. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. *FEMS Microbiology Reviews* 35, 201–232. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x

Addo, S., Carrias, A.A., Williams, M.A., Liles, M.R., Terhune, J.S., Davis, D.A., 2017. Effects of *Bacillus subtilis* strains and the prebiotic Previda® on growth, immune parameters and susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research* 48, 4798–4810. doi:10.1111/are.13300

Aly, S.M., Abdel-Galil Ahmed, Y., Abdel-Aziz Ghareeb, A., Mohamed, M.F., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 128–136. doi:10.1016/j.fsi.2008.03.013

Banerjee, G., Nandi, A., Ray, A.K., 2017. Assessment of hemolytic activity, enzyme production and bacteriocin characterization of *Bacillus subtilis* LR1 isolated from the gastrointestinal tract of fish. *Arch Microbiol* 199, 115–124. doi:10.1007/s00203-016-1283-8

Bierbaum, G., Sahl, H.-G., 2009. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol* 10, 2–18. doi:10.2174/138920109787048616

Calcagnile, M., Tredici, S.M., Alifano, P., 2024. A comprehensive review on probiotics and their use in aquaculture: Biological control, efficacy, and safety through the genomics and wet methods. *Heliyon* 10, e40892. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e40892

Chen, X., Lu, Yajun, Shan, M., Zhao, H., Lu, Z., Lu, Yingjian, 2022. A mini-review: mechanism of antimicrobial action and application of surfactin. *World J Microbiol Biotechnol* 38, 143. doi:10.1007/s11274-022-03323-3

Cheng, A.-C., Lin, H.-L., Shiu, Y.-L., Tyan, Y.-C., Liu, C.-H., 2017. Isolation and characterization of antimicrobial peptides derived from *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal and its use for preventing *Vibrio* infection in shrimp aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* 67, 270–279. doi:10.1016/j.fsi.2017.06.006

Dafale, N.A., Srivastava, S., Purohit, H.J., 2020. Zoonosis: An Emerging Link to Antibiotic Resistance Under “One Health Approach.” *Indian J Microbiol* 60, 139–152. doi:10.1007/s12088-020-00860-z

Deleu, M., Lorent, J., Lins, L., Brasseur, R., Braun, N., El Kirat, K., Nylander, T., Dufrêne, Y.F., Mingeot-Leclercq, M.-P., 2013. Effects of surfactin on membrane models displaying

lipid phase separation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828, 801–815. doi:10.1016/j.bbamem.2012.11.007

Elewasy, O.A., Elrafie, A.S., Rasheed, N.A., Adli, S.H., Younis, E.M., Abdelwarith, A.A., Davies, S.J., Ibrahim, R.E., 2024. The alleviative effect of *Bacillus subtilis*-supplemented diet against *Vibrio cholerae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet Res Commun* 48, 2513–2525. doi:10.1007/s11259-024-10418-9

Galagarza, O.A., Smith, S.A., Drahos, D.J., Eifert, J.D., Williams, R.C., Kuhn, D.D., 2018. Modulation of innate immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary supplementation of *Bacillus subtilis* endospores. *Fish & Shellfish Immunology* 83, 171–179. doi:10.1016/j.fsi.2018.08.062

Guariglia-Oropeza, V., Helmann, J.D., 2011. *Bacillus subtilis*  $\sigma^V$  Confers Lysozyme Resistance by Activation of Two Cell Wall Modification Pathways, Peptidoglycan O-Acetylation and d-Alanylation of Teichoic Acids  $\nabla$ . *J Bacteriol* 193, 6223–6232. doi:10.1128/JB.06023-11

Hazards (BIOHAZ), E.P. on B., Koutsoumanis, K., Allende, A., Álvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Argüello, H., Berendonk, T., Cavaco, L.M., Gaze, W., Schmitt, H., Topp, E., Guerra, B., Liébana, E., Stella, P., Peixe, L., 2021. Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *EFSA Journal* 19, e06651. doi:10.2903/j.efsa.2021.6651

Iqbal, S., Begum, F., Rabaan, A.A., Aljeldah, M., Al Shammari, B.R., Alawfi, A., Alshengeti, A., Sulaiman, T., Khan, A., 2023. Classification and Multifaceted Potential of Secondary Metabolites Produced by *Bacillus subtilis* Group: A Comprehensive Review. *Molecules* 28, 927. doi:10.3390/molecules28030927

Kim, Y.-O., Park, I.-S., Kim, D.-J., Nam, B.-H., Kim, D.-G., Jee, Y.-J., An, C.-M., 2014. Identification and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus* sp. SW1-1 that exhibits antibacterial activity against fish pathogens. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 57, 605–612. doi:10.1007/s13765-014-4174-1

Kılıç, N., Gültekin, G., 2024. Sustainable Approaches in Aquaculture: Pharmacological and Natural Alternatives to Antibiotics. *Mar. Sci. Tech. Bull.* 13, 239–250. doi:10.33714/masteb.1488998

Kuebutornye, F.K.A., Abarike, E.D., Lu, Y., 2019. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* 87, 820–828. doi:10.1016/j.fsi.2019.02.010

Liao, Z., Liu, Y., Wei, H., He, X., Wang, Z., Zhuang, Z., Zhao, W., Masagounder, K., He, J., Niu, J., 2023. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* DSM 32315 on growth, immune response and acute ammonia stress tolerance of Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus*) fed with high or low protein diets. *Animal Nutrition* 15, 375–385. doi:10.1016/j.aninu.2023.05.016

Liu, H., Wang, S., Cai, Y., Guo, X., Cao, Z., Zhang, Y., Liu, S., Yuan, W., Zhu, W., Zheng, Y., Xie, Z., Guo, W., Zhou, Y., 2017. Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 60, 326–333. doi:10.1016/j.fsi.2016.12.003

Liu, J., Li, W., Zhu, X., Zhao, H., Lu, Y., Zhang, C., Lu, Z., 2019. Surfactin effectively inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation on surfaces. *Applied Microbiology & Biotechnology* 103, 4565–4574. doi:10.1007/s00253-019-09808-w

Mumbo, M.T., Nyaboga, E.N., Kinyua, J., Muge, E.K., Mathenge, S.G.K., Muriira, G., Rotich, H., Njiraini, B., Njiru, J.M., 2023. Prevalence and antimicrobial resistance profile of bacterial foodborne pathogens in Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) at points of retail sale in Nairobi, Kenya. *Front. Antibiot.* 2. doi:10.3389/frabi.2023.1156258

Nakharuthai, C., Boonanuntanasarn, S., Kaewda, J., Manassila, P., 2023. Isolation of Potential Probiotic *Bacillus* spp. from the Intestine of Nile Tilapia to Construct Recombinant Probiotic Expressing CC Chemokine and Its Effectiveness on Innate Immune Responses in Nile Tilapia. *Animals* 13, 986. doi:10.3390/ani13060986

Olmos, J., Acosta, M., Mendoza, G., Pitones, V., 2020. *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Arch Microbiol* 202, 427–435. doi:10.1007/s00203-019-01757-2

Petit, C., Caudal, F., Taupin, L., Dufour, A., Le Ker, C., Giudicelli, F., Rodrigues, S., Bazire, A., 2024. Antibiofilm Activity of the Marine Probiotic *Bacillus subtilis* C3 Against the Aquaculture-Relevant Pathogen *Vibrio harveyi*. *Probiotics & Antimicro. Prot.* doi:10.1007/s12602-024-10229-z

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., 2018. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signaling interference. *Nature* 562, 532–537. doi:10.1038/s41586-018-0616-y

Riley, M.A., Wertz, J.E., 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Review of Microbiology* 56, 117–137. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.161024

Shaheer, P., Sreejith, V.N., Joseph, T.C., Murugadas, V., Lalitha, K.V., 2021. Quorum quenching *Bacillus* spp.: an alternative biocontrol agent for *Vibrio harveyi* infection in aquaculture. *Diseases of Aquatic Organisms* 146, 117–128. doi:10.3354/dao03619

Song, Q., Xiao, Y., Xiao, Z., Liu, T., Li, J., Li, P., Han, F., 2021. Lysozymes in Fish. *J. Agric. Food Chem.* 69, 15039–15051. doi:10.1021/acs.jafc.1c06676

- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56, 845–857. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x
- Stein, T., Borchert, S., Conrad, B., Feesche, J., Hofemeister, B., Hofemeister, J., Entian, K.-D., 2002. Two Different Lantibiotic-Like Peptides Originate from the Ericin Gene Cluster of *Bacillus subtilis* A1/3. *J Bacteriol* 184, 1703–1711. doi:10.1128/JB.184.6.1703-1711.2002
- Telli, G.S., Ranzani-Paiva, M.J.T., Dias, D. de C., Sussel, F.R., Ishikawa, C.M., Tachibana, L., 2014. Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish & Shellfish Immunology* 39, 305–311. doi:10.1016/j.fsi.2014.05.025
- The State of World Fisheries and Aquaculture 2024, 2024. . FAO. doi:10.4060/cd0683en
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria.
- Won, S., Hamidoghli, A., Choi, W., Park, Y., Jang, W.J., Kong, I.-S., Bai, S.C., 2020. Effects of *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactococcus lactis* on Growth, Immune Responses, Histology and Gene Expression in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* 8, 0. doi:10.3390/microorganisms8010067
- Xia, Y., Wang, M., Gao, F., Lu, M., Chen, G., 2020. Effects of dietary probiotic supplementation on the growth, gut health and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Nutrition* 6, 69–79. doi:10.1016/j.aninu.2019.07.002
- Zhang, J., Kong, X., Zhou, C., Li, L., Nie, G., Li, X., 2014. Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: Ligand specificity and signal pathways. *Fish & Shellfish Immunology* 41, 380–388. doi:10.1016/j.fsi.2014.09.022
- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., Li, W., 2010. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiol Biochem* 36, 501–509. doi:10.1007/s10695-009-9320-z
- Zhou, Z., Xiang, L., Wang, X., Jiang, G., Cheng, J., Cao, X., Fan, X., Shen, H., 2025. An in-depth study of the growth inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* by Surfactin and its effects on cell membranes, ROS levels and gene transcription. *Journal of Invertebrate Pathology* 211, 108298. doi:10.1016/j.jip.2025.108298

## 1. Annexes

Souche de <i>Bacillus subtilis</i>	Dosage	Distribution	Durée de l'étude	Nombre total de poissons	Dans quelles conditions	Challenge test	Effets observés sur l'immunité et la résistance aux pathogènes	Source
<i>Bacillus subtilis</i>	1x10 <sup>8</sup> CFU/g	Alimentation	6 semaines	720	60 poissons par cuves de 50L Renouvellement de 50% de l'eau tous les jours.	<i>Streptococcus agalactiae</i> (injection intra-péritonéale)	Expression plus élevée du lysozyme de type C mais moins que pour <i>Bacillus Cereus</i> . Le taux de mortalité, suite au challenge test, n'a pas été diminué pour le groupe de <i>Bacillus subtilis</i> .	(Xia et al., 2020)
<i>Bacillus subtilis</i> C-3102	5x10 <sup>6</sup> CFU/g	Alimentation	84 jours	520	Elevage à deux niveaux de densité (18,75 fish m <sup>-3</sup> et 62,50 fish m <sup>-3</sup> )	Exposition à une densité importante d'individus	Expression du lysozyme plus élevée pour les poissons nourris avec <i>Bacillus subtilis</i> en conditions de haute densité. A basse densité, pas de différence de lysozyme entre le groupe contrôle et probiotique.	(Telli et al., 2014)
<i>Bacillus subtilis</i> WB60	1x10 <sup>7</sup> CFU/g (BS7) 1x10 <sup>8</sup> CFU/g (BS8)	Alimentation	8 semaines	480	20 poissons par cuves de 40L avec flux de 1,5L/min d'eau fraîche filtrée	<i>Aeromonas hydrophila</i> (injection intra-péritonéale de 0,5 ml d'une solution à 2x10 <sup>7</sup> CFU/g)	L'activité du lysozyme significativement augmenté pour BS8. L'activité de la SOD et la MPO et le taux de survie au challenge test significativement augmentées pour BS8 et BS7	(Won et al., 2020)

Tableau 1 : Tableau reprenant les études traitant de l'utilisation de *Bacillus subtilis* chez le Tilapia du Nil

<i>Bacillus subtilis</i> NZ86 Et <i>Bacillus subtilis</i> O14VRQ	1x10 <sup>7</sup> spores/g	Alimentation	51 jours	60	20 poissons par cuve de 300L avec utilisation d'un système d'aquaculture en recirculation	/	L'activité phagocytaire des leucocytes est accrue mais pas de manière significative. Augmentation significative cytokines pro-inflammatoire pour la souche O14VRQ. Quantité de lysozyme significativement augmentée pour les deux souches.	(Galagarza et al., 2018)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1x10 <sup>7</sup> CFU/g	Alimentation	8 semaines	1920	30 poissons par cuve 150L d'eau avec renouvellement quotidien de l'eau	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> et <i>Streptococcus iniae</i> (0,5 ml de 10 <sup>8</sup> bactéries ml <sup>-1</sup> )	Les valeurs de l'activité du lysozyme et de l'effet bactéricide du sérum significativement supérieures au groupe contrôle. Taux de mortalité diminué suite à l'utilisation du probiotique lors du challenge test.	(Aly et al., 2008)

Tableau 1 : Tableau reprenant les études traitant de l'utilisation de *Bacillus subtilis* chez le Tilapia du Nil

<i>Bacillus subtilis</i> SB3086 SB3295 SB3615 Individuellement ou combinaison entre SB3086 et SB3615	4x10 <sup>7</sup> CFU/g	Alimentation	21 jours	Non précisé	28 poissons par cuve de 45L d'eau	<i>Streptococcus</i> <i>iniae</i> (injection intra-péritonéale de 200µl d'une suspension afin d'obtenir 8x10 <sup>6</sup> CFU par poisson)	Les valeurs de l'activité du lysozyme, de l'effet bactéricide du sérum, du taux de survie significativement supérieures au groupe contrôle. Pas de différence significative entre l'utilisation individuelles des souches ou la combinaison de deux d'entre elles.	(Addo et al., 2017)
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 32315	2x10 <sup>9</sup> CFU/g dans le composé utilisé mais soit 0%, 0,1%, 0,2% et 0,3% de la composition de l'aliment	Alimentation	8 semaines	1200	30 poissons par cuve de 240L d'eau	Quantité accrue d'ammonium	Valeurs du lysozyme, complément, l'IL-10 et de la « capacité antioxydante totale » significativement augmentées par l'ajout de <i>Bacillus subtilis</i> . « La capacité antioxydante totale » était significativement plus importante avec une supplémentation à 0,3%. La malondialdéhyde était significativement diminuée lors de l'utilisation de <i>Bacillus</i> . Pour les valeurs de HSP70	(Liao et al., 2023)

Tableau 1 : Tableau reprenant les études traitant de l'utilisation de *Bacillus subtilis* chez le Tilapia du Nil



<i>Bacillus subtilis</i> HAINUP40	1x10 <sup>8</sup> CFU/g	Alimentation	8 semaines	160	20 poissons par cuve de 300L avec un système de flux de circulation d'eau à 0,2L/min	<i>Streptococcus agalactiae</i> (injection intrapéritonéale de 1,5x10 <sup>6</sup> CFU/g)	Accroissement significatif de la production d'espèces réactives de l'oxygènes et de l'activité du lysozyme après 2 semaines. La capacité antioxydante totale et l'activité de la superoxyde dismutase augmentée significativement après 8 semaines. Diminution du taux de mortalité pour le groupe traité.	(Liu et al., 2017)
<i>Bacillus subtilis</i> B10	1x10 <sup>7</sup> CFU/ml	Directement dans l'eau	40 jours	360	30 poissons	/	L'activité de la superoxyde dismutase et de la catalase étaient significativement augmentées dans le groupe traité. Pas de différence significative entre le groupe traité et le contrôle pour « la capacité antioxydante totale », la myéloperoxydase et le lysozyme. La production d'espèces réactives de l'oxygène était significativement supérieure dans les groupes traités.	(Zhou et al., 2010)

Tableau 1 : Tableau reprenant les études traitant de l'utilisation de *Bacillus subtilis* chez le Tilapia du Nil

<i>Bacillus subtilis</i> QST713	1x10 <sup>5</sup> CFU/kg d'aliment	Alimentation	10 jours	180	30 poissons par aquarium de 96l	<i>Vibrio cholerae</i>	Le taux de survie était significativement amélioré par l'utilisation de <i>Bacillus subtilis</i> en comparaison au groupe contrôle. Le nombre total de leucocytes, l'activité bactéricide du sérum, les paramètres anti- oxydants était plus important avec une diminution de la malondialdéhyde suite à l'administration de <i>Bacillus subtilis</i>	(Elewasy et al., 2024)
------------------------------------	---------------------------------------	--------------	----------	-----	------------------------------------	------------------------	--	---------------------------

Tableau 1 : Tableau reprenant les études traitant de l'utilisation de *Bacillus subtilis* chez le Tilapia du Nil

