

## **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'une des espèces les plus étudiées 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 one of 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 travail de fin d'étude.

Tout d'abord, un grand merci à mon tuteur, Mr Georges Daube pour ses conseils, ses suggestions et remarques constructives formulées au cours des nombreuses relectures. Vous m'avez permis de garder le cap tout au long de ce travail.

Je remercie également le professeur Alain Vanderplasschen pour ses précieux conseils m'ayant aidé à cibler un sujet pertinent et cohérent avec mes objectifs.

Un grand merci encore à l'ensemble des piscicultures ayant pris le temps de répondre à mon questionnaire et m'ayant dès lors permis d'ajouter une dimension locale et concrète à ce travail bibliographique.

Enfin, merci du fond du cœur, à ma famille qui a fait preuve de beaucoup de courage et patience pour me soutenir, même lorsque le stress et la nervosité m'envahissaient.

## 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. Sécurité des souches probiotiques utilisées .....	10
1.5.3. Résistance des souches probiotiques utilisées .....	10
2. Mécanismes d'action de <i>Bacillus subtilis</i> et démonstration <i>in vitro</i> .....	10
2.1. Peptides anti-microbiens .....	10
2.1.1. Les bactériocines.....	12
2.1.2. Les lantibiotiques.....	13
2.1.3. Les lipopeptides .....	17
2.1.4. Le lysozyme .....	19
2.1.5. Le quorum quenching.....	20
2.2. Souches à potentiel probiotique et leurs effets .....	23
3. Mécanismes mis en œuvre par <i>Bacillus subtilis</i> <i>in vivo</i> sur le Tilapia du Nil. ....	29
3.1. Effets sur l'immunité innée.....	34
3.1.1. Détection des agents bactériens par l'hôte .....	34
3.1.2. Composants de l'immunité innée et mécanismes d'autoprotection de <i>Bacillus subtilis</i> .....	35
3.2. Effets sur l'immunité adaptative .....	37
3.3. Résistance au stress et aux pathogènes .....	37
3.4. Viabilité et persistance après ingestion .....	39
3.5. Impacts de la durée d'administration .....	39
3.6. Association de probiotiques .....	41
4. Discussion .....	42
5. Conclusion .....	48
6. Déclaration d'utilisation de l'IA générative et des technologies assistées par l'IA dans le processus de rédaction.....	48
7. Bibliographie .....	48

## Table des tableaux

Tableau I. Cibles et effets des substances antimicrobiennes.....	11
Tableau II. Classification des bactériocines de <i>Bacillus subtilis</i> .....	12
Tableau III. Spectre d'activité de souches de <i>Bacillus subtilis</i> .....	24
Tableau IV. Inhibition de divers agents bactériens par des souches de <i>Bacillus subtilis</i> .....	28
Tableau V. Etudes de <i>Bacillus subtilis</i> chez le Tilapia du Nil .....	30
Tableau VI. Persistance dans l'intestin de <i>Bacillus subtilis</i> après ingestion .....	39
Tableau VII. Taux de protection de probiotiques face à divers agents bactériens .....	41
Tableau VIII. Effets de l'associations de probiotiques.....	41
Tableau IX. Moyens de lutte énoncés par les répondants .....	44

# 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. En 2022, la production mondiale de produits animaux d'origine aquatique a atteint les 185,4 millions de tonnes dont 94,4 tonnes 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 et constitue donc l'une des espèces de 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

Comme tout système de production, l'aquaculture est concernée par le développement de résistances bactériennes aux antibiotiques (Hazards (BIOHAZ) et al., 2021). Les antibiotiques utilisés ne sont généralement pas totalement métabolisés et peuvent donc entrer en contact avec d'autres organismes. Le transfert de ce type de gènes peut se faire entre micro-organismes, pathogènes ou non, et qu'ils soient d'origine animale ou humaine. (Dafale et al., 2020). En aquaculture, les antibiotiques sont incorporés aux aliments ou directement injectés dans l'eau des bassins, et entrent donc en contact avec l'environnement. L'eau, les sédiments et les aliments sont donc des sources potentielles de transmission de gènes de résistance entre bactéries (Hazards (BIOHAZ) et al., 2021).



Des analyses de l'eau de distribution de plusieurs villes du Michigan et de l'Ohio, ou encore des analyses réalisées directement sur des poissons provenant d'un marché au Kenya, ont permis de détecter la présence de bactéries résistantes à divers antibiotiques. Ces exemples laissent 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. (Dafale et al., 2020; 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 cette utilisation. C'est dans cet ordre d'idée que des recherches sont menées sur des vaccins, 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 « des 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 soient des bactéries ou non, leur capacité à produire des spores, leur composition (un seul ou de plusieurs micro-organismes) ou encore s'il fait partie de la flore commensale de l'hôte. (Calcagnile et al., 2024).

#### 1.4.2. Rôle

Les bactéries utilisées en tant que probiotique jouent des rôles variés, que ce soit au niveau intestinal, de l'immunité ou encore sur la qualité de l'eau (figure 1). (Kuebutornye et al., 2019; Calcagnile et al., 2024)

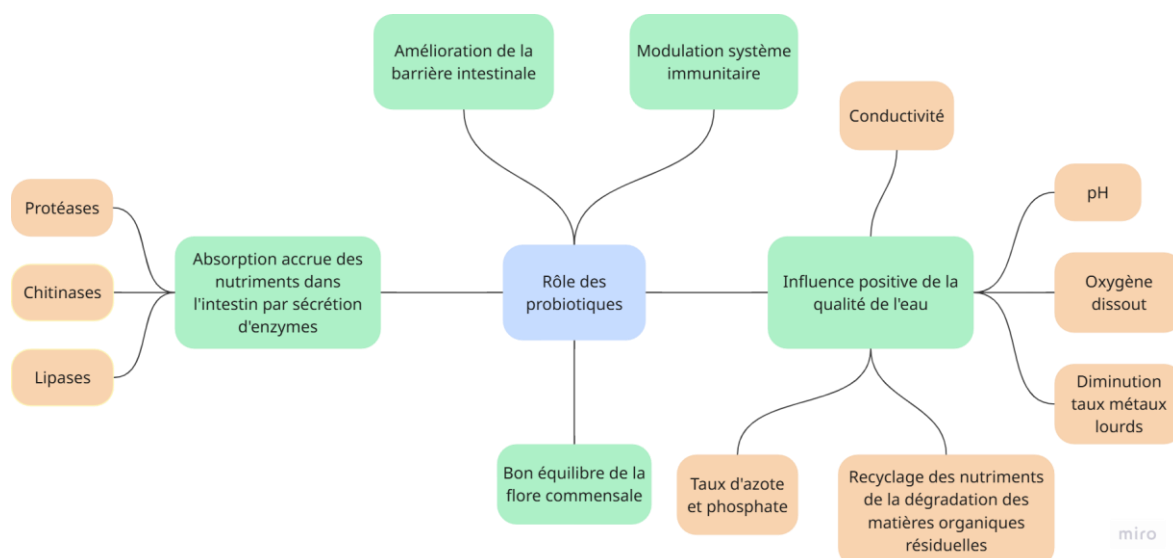


Figure 1. Ensemble des rôles joués par les probiotiques au niveau intestinal, de l'immunité et de la qualité de l'eau (Kuebutornye et al., 2019; Calcagnile et al., 2024).

Les bactéries Gram négatives disposent de lipopolysaccharides (considérés comme des endotoxines), expliquant donc que la majorité des probiotiques découverts font partie de la famille des Gram positives, comme celles du genre *Bacillus*, *Lactobacillus* ou encore *Bifidobacterium*, qui n'en disposent pas. Cependant, ces bactéries 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. (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 ou désinfectants (Kuebutornye et al., 2019). Leur culture est aisée du fait de leur taux de répllication rapide, de leurs besoins nutritionnels faibles et de leur capacité à résister dans des conditions anaérobies une fois sous la forme de spores. Les bactéries du genre *Bacillus* ont une capacité à sécréter des peptides antimicrobiens disposant de la capacité de dégrader des bactéries et leur biofilm, champignons et virus (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). 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).

### 1.5.2. Sécurité des souches probiotiques utilisées

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

Tout d'abord, il est important de connaître la sécurité de la souche utilisée, afin d'éviter que son administration puisse porter préjudice à son hôte. On vérifie notamment l'absence d'activité hémolytique des nouvelles souches étudiées, sachant que cette activité conférerait à la bactérie un pouvoir pathogène lui permettant la dégradation des globules rouges. Des tests *in vivo*, avec les probiotiques potentiel, sont aussi nécessaires pour attester de cette sûreté. (Banerjee et al., 2017).

Il est également nécessaire de s'assurer qu'elles ne disposent pas de gènes de résistance aux antibiotiques et qu'elles ne participent donc pas au phénomène d'antibiorésistance (Calcagnile et al., 2024)

### 1.5.3. 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, de salinité et de températures doit être démontrée. (Banerjee et al., 2017; Shaheer et al., 2021). Ces tests peuvent être réalisés, soit directement sur la bactérie, soit sur les substances antimicrobiennes produites par l'agent. (Banerjee et al., 2017). Ils 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 ainsi qu'en 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

*Bacillus subtilis* présente la capacité de produire un nombre important de peptides à activité antimicrobienne. Par exemple, une étude sur *Bacillus subtilis* E20, isolé de farines de soja

fermentées, a montré que ses peptides antimicrobiens endommagent la membrane de *Vibrio alginolyticus* et *Vibrio parahaemolyticus*. Des observations microscopiques et en culture ont révélé que, *Vibrio alginolyticus*, possédait des lésions à sa surface. Pour les deux pathogènes, une augmentation de la perméabilité membranaire a été constatée. Cela suggère que ces peptides agissent sur l'intégrité de la membrane, pouvant aller jusqu'à la formation de pores.(Cheng et al., 2017).

Le tableau I, ci-dessous, reprend l'ensemble des substances antimicrobiennes qui seront discutées dans ce chapitre.

*Tableau I. Cibles et effets des substances antimicrobiennes*

<b>Peptides-anti microbiens</b>	<b>Classification</b>	<b>Cible</b>	<b>Effets</b>	<b>Référence</b>
Subtiline	Classe I des bactériocines sous classe 1 : Lantibiotique de type A	Bactéries Gram +	Perméabilisation membranaire par interaction avec le lipide II et inhibition de la production de la paroi bactérienne.	Stein, 2005 Bauer and Dicks, 2005; Mercado and Olmos, 2022
Ericine A	Classe I des bactériocines sous classe 1 : Lantibiotique de type A	Bactéries Gram +	Perméabilisation membranaire par interaction avec le lipide II et inhibition de la production de la paroi	Stein et al., 2002; Mercado and Olmos, 2022
Ericine S	Classe I des bactériocines sous classe 1 : Lantibiotique de type A	Bactéries Gram +	Perméabilisation membranaire par interaction avec le lipide II et inhibition de la production de la paroi.	Stein et al., 2002; Mercado and Olmos, 2022
Mersacidine	Classe I des bactériocines sous classe 2 Lantibiotique de type A	Bactéries Gram +	Perméabilisation membranaire par interaction avec le lipide II et inhibition de la production de la paroi.	Mercado and Olmos, 2022
Sublancine 168	Classe I des bactériocines sous classe 2 Lantibiotique de type B	Bactéries Gram +	Inhibition d'enzymes nécessaires à la formation des parois cellulaires.	Bierbaum and Sahl, 2009
Subtilosine A	Classe I des bactériocines sous classe 4	Bactéries Gram + et Gram -	Insertion au sein des membranes et dégradation de celles-ci. Inhibition d'enzymes nécessaires à la formation des parois cellulaires.	Shelburne et al., 2007; Bierbaum and Sahl, 2009; Mercado and Olmos, 2022

Surfactine	Lipopeptide cyclique	Bactéries Gram + et Gram – Champignons Virus Quorum quencher	Inhibition du « quorum sensing », de la formation du biofilm, insertion au sein des membranes et dégradation de celles-ci.	Deleu et al., 2013; Liu et al., 2019; Petit et al., 2024; Zhou et al., 2025
Fengycine	Lipopeptide cyclique	Quorum quencher	Inhibition du « quorum sensing »	(Piewngam et al., 2018)
Lysozyme	Enzyme antimicrobienne	Surtout sur les Gram + Léger effet bactéricide sur les Gram -	Hydrolyse de la liaison entre l'acide N-acétylmuramique et N-acétylglucosamine.	Song et al., 2021

*Différents peptides à action antimicrobienne, produits par Bacillus subtilis, discutés dans ce chapitre. On y trouve la classe à laquelle ils font partie, les organismes qu'ils ciblent et la manière dont ils agissent.*

### 2.1.1. Les bactériocines

Dans l'ensemble des substances produites par *Bacillus*, on retrouve les bactériocines. (Banerjee et al., 2017). Il s'agit de peptides anti-microbiens qui, comme leur nom l'indique, sont actifs contre les bactéries et qui sont produits via une synthèse par les ribosomes (Abriouel et al., 2011; Banerjee et al., 2017). Ces molécules sont classées selon deux systèmes, l'un spécifique pour les bactéries lactiques, lui-même composé de deux groupes selon la structure et le mode d'action des molécules, et l'autre créé pour *Bacillus*, par Abriouel et al (2011) (tableau II). (Riley and Wertz, 2002; Bierbaum and Sahl, 2009; Abriouel et al., 2011; Soltani et al., 2019)

*Tableau II. Classification des bactériocines de Bacillus subtilis*

<b>Classification des bactériocines produites par <i>Bacillus subtilis</i></b>	<b>Exemples</b>	<b>Classification des bactériocines produites par les bactéries lactiques</b>
Classe I. Peptides modifiés post traductionnellement	/	Classe I. Les lantibiotiques
<i>Sous-classe I.1. Peptides uniques, lantibiotiques allongés</i>	<b>Subtiline, ericine S, ericine A</b>	De type A
<i>Sous-classe I.2. Autres lantibiotiques à peptide unique</i>	<b>Sublancine 168, mersacidine, paenibacilline</b>	De type B
<i>Sous-classe I.3. Lantibiotiques à deux peptides</i>	Haloduracine, lichenicidine	/
<i>Sous-classe I.4. Autres peptides modifiés post traductionnellement</i>	<b>Subtilosine A</b>	/

Classe II Peptides non modifiés	/	Classe II. Petits peptides linéaires
<i>Sous-classe II.1. Peptides de type Pediocine</i>	Coaguline, SRCAM 37, SRCAM 602, SRCAM 1580	/
<i>Sous-classe II.2. Peptides de type Thuricine</i>	Thurincine H, thuricine S, thuricine 17, bacthuricine F4, cerein MRX1	/
<i>Sous-classe II.3. Autres peptides linéaires</i>	Cereine 7A, cereine 7B, lichenin, thuricine 439	/
Classe III. Grandes protéines	Megacine A-216, megacine A-19213	Classe III. Large bactériocines thermolabiles.

Classification déterminée par Abriouel et al (2011), pour les bactériocines produites par *Bacillus*, avec également, en comparaison, celle utilisée spécifiquement pour les bactéries lactiques mais également utilisées pour *Bacillus*. Les molécules en gras sont celles produites par *Bacillus subtilis*, les autres sont produites par d'autres espèces du genre *Bacillus*. (Bierbaum and Sahl, 2009; Abriouel et al., 2011).

La subtilosine A (figure 2), fait partie de la sous-classe I.4 et est produite notamment par la souche ATCC 6633 de *Bacillus subtilis*. Elle est intégrée dans le groupe des peptides modifiés post traductionnellement et produits par les ribosomes mais pas au niveau des lantibiotiques. L'absence de lanthionine et/ou méthyllanthionine dans sa structure, ainsi que sa nature particulière entièrement cyclique, la distingue des sous classes I.1 à I.3, celles des lantibiotiques (Abriouel et al., 2011).

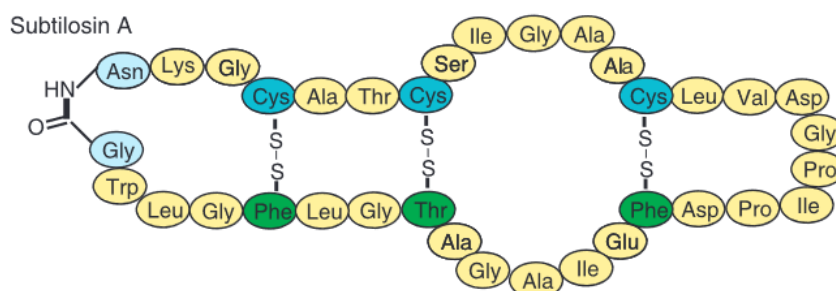


Figure 2. Représentation moléculaire de la subtilosine A (Abriouel et al., 2011)

### 2.1.2. Les lantibiotiques

Les lantibiotiques sont des peptides faisant partie de la classe I des bactériocines (Riley and Wertz, 2002). Ils sont composés d'acides aminés particuliers, à savoir, la lanthionine et la bêta-méthyllanthionine, et également d'acides aminés déshydratés tels que la déhydroalanine et la déhydrobutyrine. La lanthionine est formée par la liaison entre le thiol du résidu cystéine localisé en amont, et la double liaison se trouvant au sein de la déhydroalanine. Il s'agit du même procédé de formation pour la méthyllanthionine mais avec cette fois la déhydrobutyrine

(Bauer and Dicks, 2005). La modification de ces précurseurs est réalisée de manière post-traductionnelle (Bierbaum and Sahl, 2009).

Les lantibiotiques de type A (figure 3) qui font partie de la sous-classe I.1, correspondent 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);

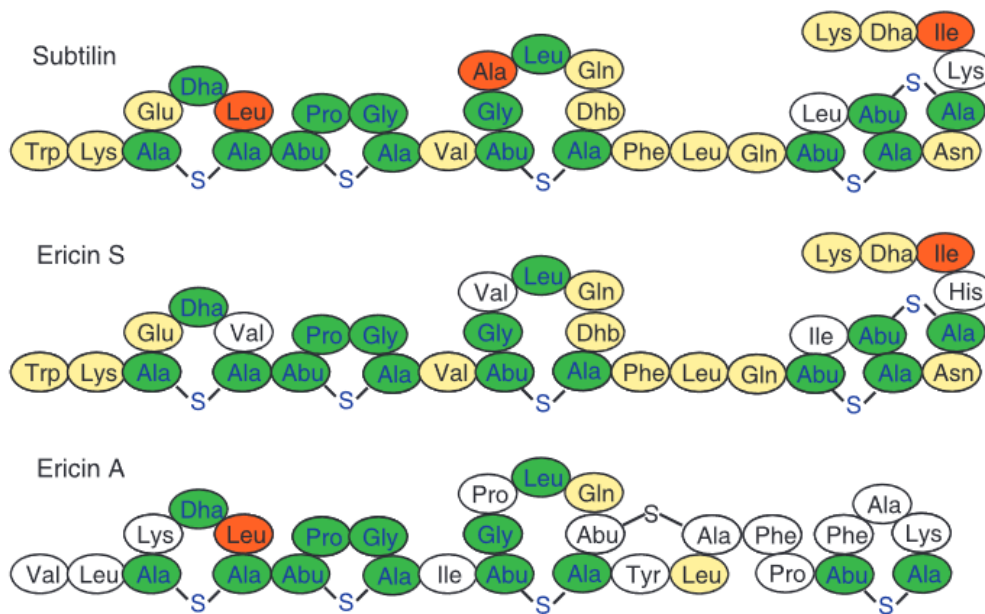


Figure 3. Représentation moléculaire de trois lantibiotiques de type A (Abriouel et al., 2011)

Le mécanisme d'action de ces divers lantibiotiques repose sur l'interaction qu'ils ont avec les membranes et parois bactériennes. La subtiline provoque la formation de pores au niveau de la membrane des bactéries Gram positives, engendrant le passage d'ions et modifiant ainsi le potentiel de membrane et le gradient ionique de la cellule. Ces pores se forment après l'interaction entre la subtiline et le pyrophosphate composant le lipide II. Le ciblage de ce pyrophosphate empêche son implication dans la formation des peptidoglycanes composant la paroi cellulaire. La paroi cellulaire a pour but de protéger la bactérie face à l'environnement extérieur. La dégradation et l'incorporation de nouveaux peptidoglycanes au sein de cette paroi se fait en permanence. Or si de nouveaux peptidoglycanes ne sont pas disponibles, ce cycle de renouvellement s'interrompt. Une étude a pu démontrer que la formation de pores membranaire est associée à la présence concomitante de la subtiline et du lipide II. En effet, lors de la mise en contact de la subtiline avec des vésicules lipidiques ne contenant pas de



lipide II, aucune dégradation n'avait lieu. Or une fois la présence de ce lipide au sein des membranes, la formation des pores avait lieu. Ces interactions sont représentées ci-dessous (Figure 4) (Parisot et al., 2008).

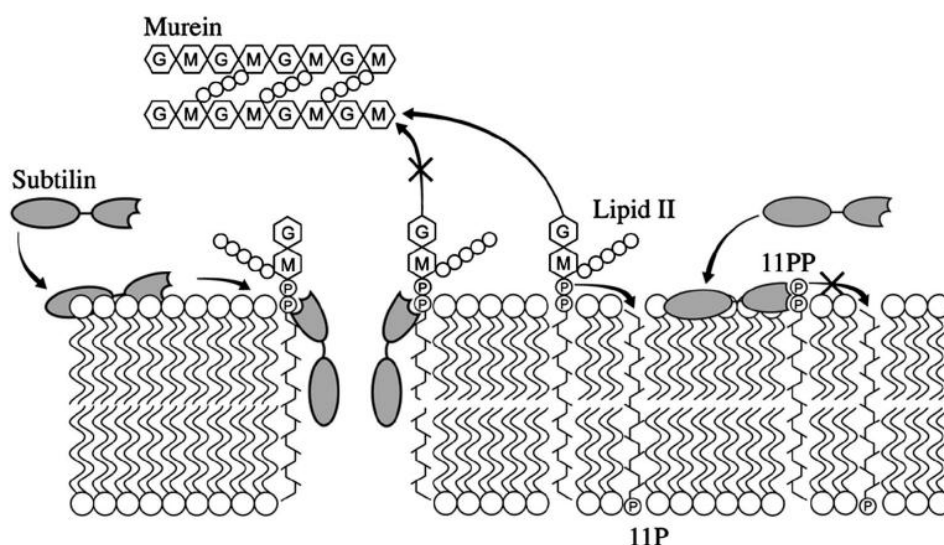


Figure 4. Insertion de la subtiline au niveau du groupe pyrophosphate composant le lipide II, un précurseur nécessaire à la synthèse des peptidoglycanes, une molécule composant les parois cellulaires. Cette insertion perturbe, d'une part, la membrane cellulaire, aboutissant à la formation de pores. D'autre part, elle empêche la translocation des résidus N-acétylglucosamine et N-acétylmuramique nécessaires à l'assemblage des peptidoglycanes (muréine), compromettant la structure des parois cellulaires des bactéries Gram positives. (Parisot et al., 2008)

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*, *Lactobacillus sakei*, *Bacillus megaterium* et *Clavibacter michiganensis*. On pouvait observer une zone d'inhibition de la croissance des différents agents bactériens 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 (figure 5) (Stein et al., 2002).



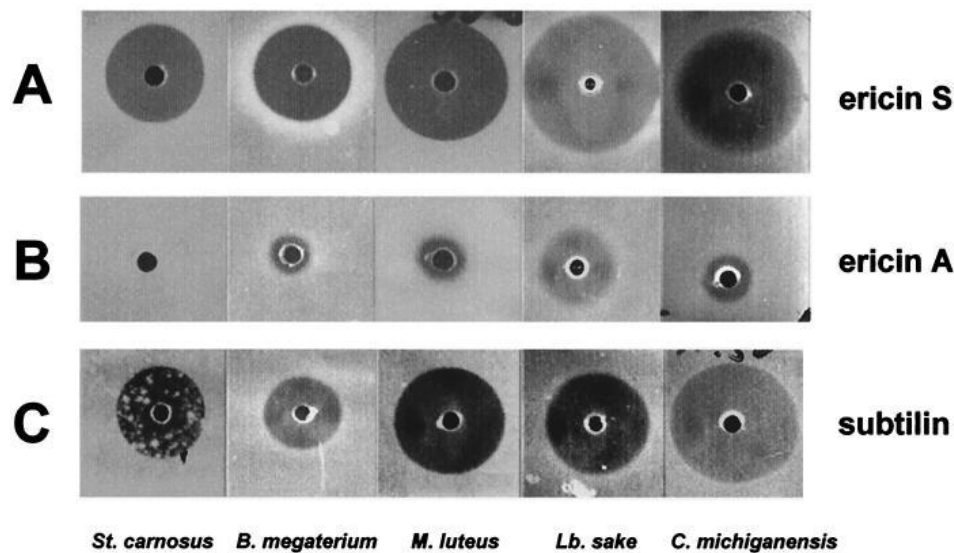


Figure 5. Zones d'inhibition formées par l'ericine S, l'ericine A ainsi que la subtiline au niveau de *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Lactobacillus sake* et *Clavibacter michiganensis* (Stein et al., 2002).

Les lantibiotiques de type B qui font eux partie de la sous-classe I.2, inhibent la formation des parois cellulaires . (Bierbaum and Sahl, 2009). Contrairement aux lantibiotiques de type A, ceux-ci sont de forme plus globulaire et sont non chargés (Abriouel et al., 2011).

Les lantibiotiques ont généralement une action sur les bactéries Gram positives alors que les Gram négatives y sont résistantes. L'activité inhibitrice de la sublancine 168 (figure 6), face à diverses bactéries fut testée pour cette molécule. 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 est 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).

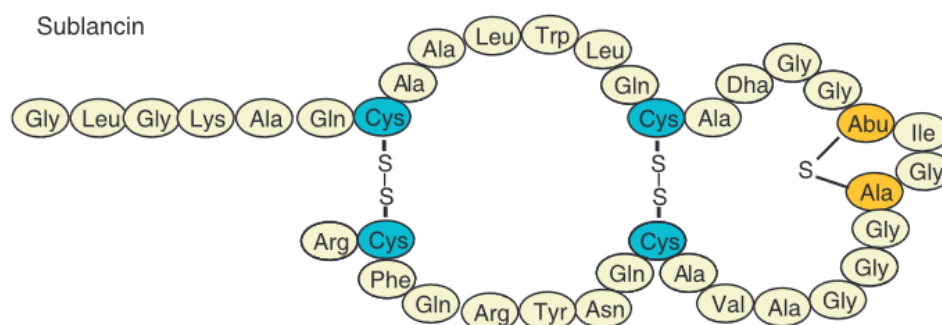


Figure 6. Représentation moléculaire de la sublancine (Abriouel et al., 2011)

Il produit également la mersacidine (figure 7) qui utilise le même mode d'action que la subtiline, à savoir, l'interaction avec le lipide II et, de ce fait, empêche la synthèse des parois cellulaires (Abriouel et al., 2011).

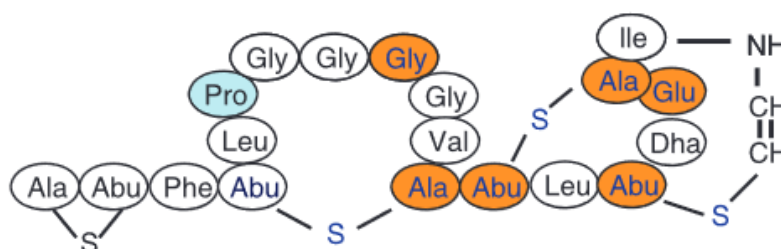


Figure 7. Représentation moléculaire de la mersacidine (Abriouel et al., 2011).

### 2.1.3. Les lipopeptides

Les lipopeptides peuvent être linéaires ou 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 8) est un des membres de cette famille. Elle 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 cinq 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).

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*. Différentes manipulations ont été réalisées afin de comprendre l'impact de cette souche de *Bacillus subtilis*. Le biofilm de cette bactérie fut incubé pendant 24h avec l'agent pathogène afin de vérifier l'action préventive de ce 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% du biofilm formé sans mise en contact avec ce lipopeptide, 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).

En diminuant l'expression du gène *icaADBC*, codant notamment pour l'adhésine, un polysaccharide, la surfactine contrecarre la formation des biofilms. Ce polysaccharide permet l'adhésion entre les cellules afin de pouvoir construire le biofilm (Liu et al., 2019).

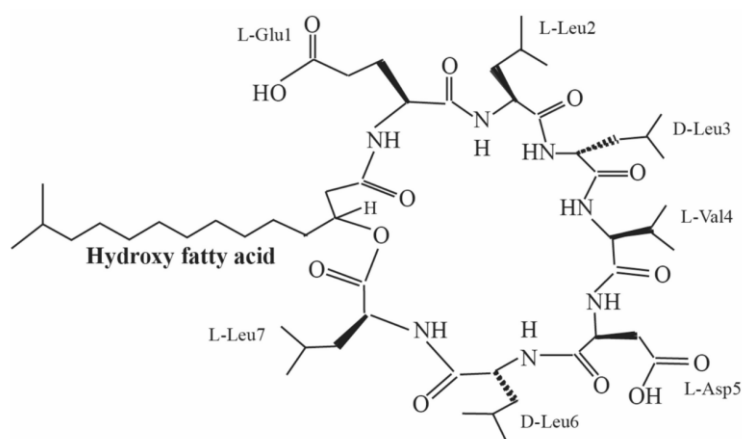


Figure 8. Structure chimique de la surfactine (Chen et al., 2022)

Une autre étude visait à mettre en évidence l'impact de la surfactine sur *Vibrio parahaemolyticus*. L'effet inhibiteur de la surfactine a 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*, à différents moments de l'exposition à la surfactine, et la réalisation d'une « PCR quantitative en temps réel » sur l'ADN formé à partir de cet ARN 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 la croissance bactérienne, de l'expression de *pirA*, un gène de virulence, ainsi que de *slyA*, un facteur de transcription de l'ADN et régulateur de l'expression de ces gènes. *SlyA* intervient également dans certaines voies métaboliques, notamment celle des glucides. (Zhou et al., 2025b).

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., 2025b)

#### 2.1.4. Le lysozyme

Certaines espèces bactériennes comme *Bacillus subtilis* produisent un lysozyme bactérien. Leur structure est très semblable à celle de lu lysozyme de type C produit notamment par les poissons. *Bacillus subtilis* BSN314 est la souche produisant la plus grande quantité de lysozyme. L'activité de ce lysozyme a été testée sur cinq types de bactéries différentes (figure 9). L'activité bactéricide fut plus importante au niveau des souches de bactéries Gram positives que Gram négatives. D'une part, la dose minimale inhibitrice était presque deux fois plus importante pour les bactéries Gram négatives que pour les Gram positives. D'autre part,

la concentration en lysozyme, nécessaire pour engendrer des modifications observables via la microscopie, sur les bactéries Gram négatives, était également plus importante que celle pour les Gram positives (Naveed et al., 2023).

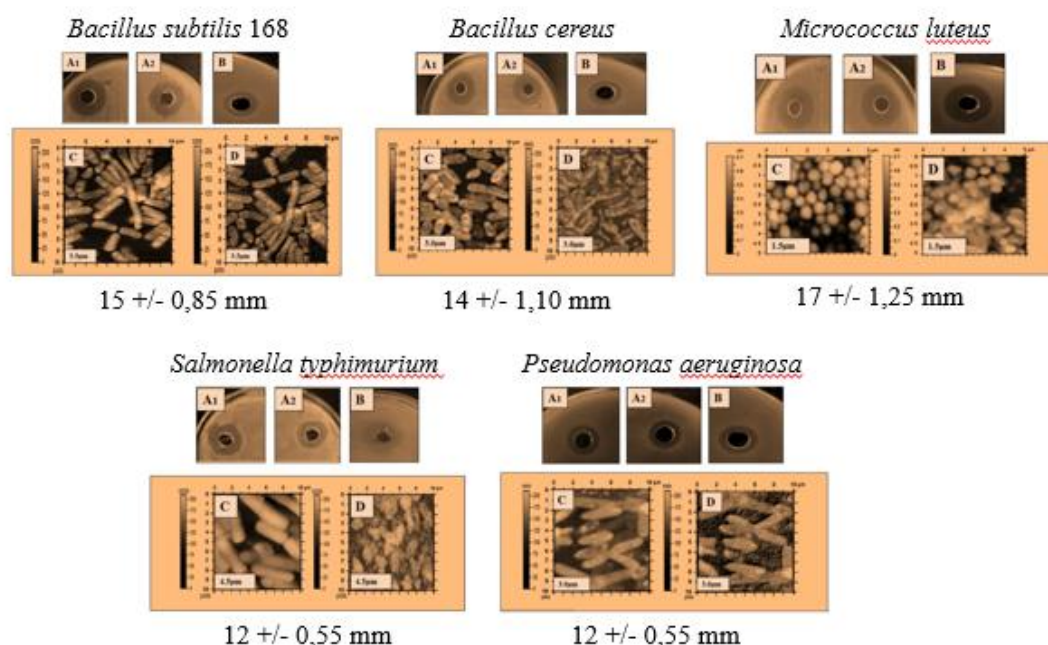


Figure 9. Zones d'inhibition produites par le lysozyme de *Bacillus subtilis* BSN314 sur 5 espèces bactériennes (Gram positives sur la première rangée et Gram négatives sur la seconde rangée), ainsi que les effets directs, observés par microscopie, sur les bactériennes. (Naveed et al., 2023)

### 2.1.5. 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 », en perturbant cette communication entre cellules, constitue un moyen d'empêcher la virulence de certaines bactéries, notamment pathogènes (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 » (Shaheer et al., 2021). Les bactéries produisent des molécules appelées des auto-inducteurs, qui se retrouvent en plus ou moins grande quantité en fonction de la densité de bactéries, provoquant un contrôle et une modification de l'expression de certains gènes ainsi que du comportement de la bactérie (Waters and Bassler, 2005). Il s'agit de molécules de signalisation qui vont pouvoir interagir avec les autres

bactéries en venant se fixer sur la paroi, liaison ligand-récepteur, permettant ainsi l'internalisation d'un message. Dans une étude où ont été prélevés des échantillons de sol d'étangs d'aquaculture et de mangroves, 118 bactéries ont été trouvées, dont trois types de *Bacillus* qui ont montré le plus haut taux de dégradation du N-acyl-homoserine lactones (AHL), 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, 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. (Shaheer et al., 2021).

Certains lipopeptides sont dotés de cette activité d'inhibition du « quorum sensing ». Une étude comprenant diverses expérimentations a permis de mieux comprendre le fonctionnement de la fengycine, un autre lipopeptide produit notamment par *Bacillus subtilis* (figure 10). Elle a été menée chez l'Homme, et plus précisément sur l'inhibition de la colonisation intestinale par *Staphylococcus aureus*, et a permis de comprendre les détails du mode d'action de ce lipopeptide, comme son lien avec l'inhibition du gène *agr*, responsable de la détection de la densité cellulaire chez *Staphylococcus aureus*. Les preuves sont issues d'études menées chez l'Homme mais l'intérêt, ici, 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 *Staphylococcus 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 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 d'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 ? La structure de ce lipopeptide est 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. La surfactine ayant une structure différente, cela explique qu'elle n'ait pas empêcher le fonctionnement d'Agr. (Piewngam et al., 2018).

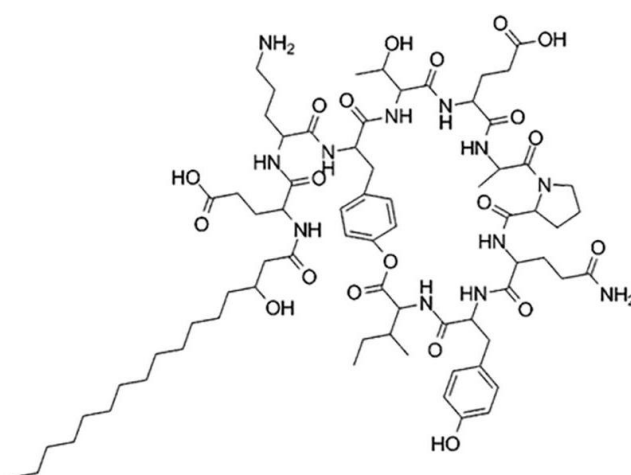


Figure 10. Structure chimique de la fengycine (Gutiérrez-Chávez et al., 2021).

La surfactine intervient également dans ce mécanisme d'inhibition. Des observations ont révélé que ce lipopeptide réprimait l'expression de l'auto-inducteur (AI-2) produit par



*Staphylococcus aureus*. 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)

Le biofilm confère une protection accrue aux bactéries qui le composent, limitant ainsi l'accessibilité par l'antibiotique. D'où l'intérêt de découvrir des souches ou composés capables de détruire ces biofilms (Petit et al., 2024).

## 2.2. Souches à potentiel probiotique et leurs effets

Différentes souches de *Bacillus subtilis* sont reprises dans les tableau III et figure 11, elles présentent des spectres d'activités variés. Diverses hypothèses peuvent être énoncées afin d'expliquer cela.

Tout d'abord, il a été décrit précédemment que *Bacillus subtilis* est connu pour la production de peptides antimicrobiens. Or, ces substances, via leur mode d'action, présentent des spectres plus ou moins larges. Si on s'intéresse à la sublancine 168, cette dernière possède, au vu de son mode d'action, une activité antimicrobienne dirigée contre les bactéries Gram positives uniquement. Cela explique que les études *in vitro* de *Bacillus subtilis* 168 aient montré une inhibition de diverses espèces de bactéries Gram positives (Paik et al., 1998). Pour un spectre d'activité orienté contre les bactéries Gram négatives, on retrouve la souche de *Bacillus subtilis* ATCC6633 (Aly et al., 2008). Il est donc facile de comprendre qu'une corrélation existe entre la souche bactérienne et le type de peptide antimicrobien que cette dernière produit.

Il est étonnant d'observer que certaines souches ne sont pas capables de se protéger face aux peptides antimicrobiens produits par d'autres souches. En effet, dans une étude menée sur *Bacillus subtilis* 168, une des bactéries inhibées par cette souche, et donc via l'action de la sublancine 168, était *Bacillus subtilis* ATCC6633 (Paik et al., 1998). Ces bactéries disposent de mécanismes immunitaires leur conférant une protection face à leurs propres bactériocines (Guariglia-Oropeza and Helmann, 2011). Cela laisse à penser que ces mécanismes sont spécifiques au peptide antimicrobien produit par la souche et ne leur octroi donc pas une immunité absolue face à d'autres types de molécules.



Tableau III. Spectre d'activité de souches de *Bacillus subtilis*

Souche	Effet inhibiteur <i>in vitro</i>	Référence
<i>Bacillus subtilis</i> A1/3	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Lactobacillus sake</i>	(Stein et al., 2002)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	<i>Aeromonas hydrophila</i> et <i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Aly et al., 2008)
<i>Bacillus subtilis</i> C3	Sur le biofilm uniquement de <i>Vibrio harveyi</i> Pas d'activité bactéricide	(Petit et al., 2024)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Forte inhibition de <i>Bacillus megaterium</i> et <i>Bacillus subtilis</i> 6633 Inhibition modérée de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Streptococcus pyogenes</i> Inhibition légère de <i>Bacillus cereus</i>	(Paik et al., 1998)
<i>Bacillus subtilis</i> VSG1	Modéré contre <i>Aeromonas hydrophila</i> , Léger contre <i>Aeromonas salmonicida</i> et <i>Vibrio harveyi</i> Absence d'inhibition de <i>Vibrio alginolyticus</i> .	(Giri et al., 2012)
<i>Bacillus subtilis</i> SG4	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Ghosh et al., 2007)
<i>Bacillus subtilis</i> GC-21	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Aeromonas punctata</i> , <i>Edwardsiella ictaluri</i> , <i>Aeromonas spuntata</i> <i>f.intestinalis</i> , <i>Vibrio flurialis</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i>	(Guo et al., 2016)
<i>Bacillus subtilis</i> GC-22	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Aeromonas punctata</i> , <i>Edwardsiella ictaluri</i> , <i>Aeromonas spuntata</i> <i>f.intestinalis</i> , <i>Vibrio flurialis</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i>	(Guo et al., 2016)
<i>Bacillus subtilis</i> LR1	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Bacillus mycoides</i> et <i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Banerjee et al., 2017)
<i>Bacillus subtilis</i> KKU213	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , et <i>Staphylococcus aureus</i> . Absence d'inhibition contre <i>Aeromonas hydrophila</i> .	(Khochamit et al., 2015)

<i>Bacillus subtilis</i> BHI344	<i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Aeromonas sobria</i> , <i>Aeromonas caviae</i>	(Luo et al., 2014)
<i>Bacillus subtilis</i> RODK28110C3	<i>Edwardsiella tarda</i> et <i>Aeromonas hydrophila</i>	(Nayak et al., 2024)
<i>Bacillus subtilis</i> AP 254	Modéré contre <i>Edwardsiella ictaluri</i> et <i>Flavobacterium columnare</i> . Léger contre <i>Aeromonas hydrophila</i> et <i>Edwardsiella tarda</i> . Absence d'effet inhibiteur contre <i>Saprolegnia ferax</i> , <i>Streptococcus iniae</i> et <i>Yersinia ruckeri</i>	(Ran et al., 2012)
<i>Bacillus subtilis</i> TLDK301120C24	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i>	(Nayak et al., 2023)

Effets antimicrobiens de plusieurs souches de *Bacillus subtilis* avec un potentiel en tant que probiotique avec les types de pathogènes étant inhibés. Un code couleur permet de distinguer la nature des micro-organismes. Bleu : bactéries Gram négatives, vert : bactéries Gram positives, orange : les champignons.

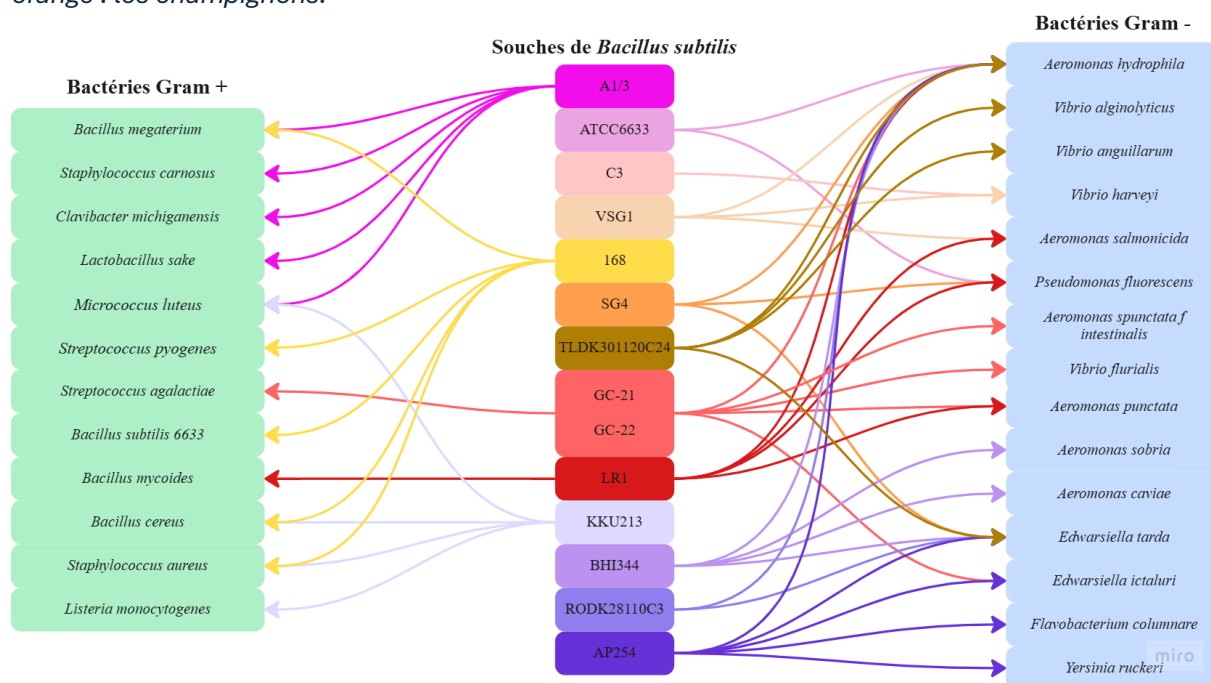


Figure 11. Différentes souches utilisées dans le tableau 3. Le même code couleur est appliqué pour cette figure. La colonne de gauche reprend les bactéries Gram positives et la colonne de droite, les bactéries Gram négatives. Les flèches relient chacune des souches de *Bacillus subtilis* (colonne centrale) aux bactéries qu'elles inhibent (colonne verte et bleue).

L'inhibition de différentes bactéries, par les souches de *Bacillus subtilis*, fut mesurée via la taille des zones d'inhibition créées par l'action de cette bactérie sur une culture des bactéries pathogènes visées. Il est pertinent de juger des différences concernant ces zones d'inhibition

entre les diverses souches étudiées et ce pour un même pathogène (tableau IV). Par exemple, dans le cas de *Aeromonas hydrophila*, la zone d'inhibition provoquée par la souche BHI344 était trois fois supérieure à celle provoquée par SG4 ou encore GC21. (Ghosh et al., 2007; Luo et al., 2014; Guo et al., 2016). Différentes hypothèses peuvent être émises afin d'apporter une explication à ces différences notables. Les souches de bactéries pathogènes utilisées ne sont pas les mêmes dans toutes les études. Si on reprend le cas précédent d'*Aeromonas hydrophila*, dans le cas de l'étude utilisant *Bacillus subtilis* BHI344, c'est *Aeromonas hydrophila* BH-002 qui fut inhibée, or pour l'étude sur *Bacillus subtilis* GC-21, c'est *Aeromonas hydrophila* XS91-4-1 qui fut cultivée. Comme cela a été énoncé précédemment pour le cas de *Bacillus subtilis*, il est possible de penser que, différentes souches d'une même espèce bactérienne, peuvent présenter des sensibilités différentes à des peptides antimicrobiens variables et donc, à des souches de *Bacillus subtilis* différentes. (Ghosh et al., 2007; Luo et al., 2014; Guo et al., 2016)

Une différence notable existe également pour *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition cinq à six fois supérieure pour *Bacillus subtilis* 168 comparé à la souche KKKU213 (Paik et al., 1998; Khochamit et al., 2015). La manière dont la manipulation a été réalisée peut expliquer cette différence. En effet, concernant la souche 168, c'est directement la bactériocine de type sublancine qui fut appliquée. Elle a été isolée et purifiée depuis le surnageant de culture de la bactérie. La dose de bactériocine est donc connue (Paik et al., 1998). Dans le cas de l'étude menée avec la souche KKKU213, le surnageant de culture de la bactérie, contenant notamment la substance bioactive, fut utilisé (Khochamit et al., 2015). Ce n'est pas donc pas ici, la bactériocine pure qui fut appliquée, d'autres éléments contenus dans le surnageant ont pu interagir avec cette substance ou simplement le fait que la bactériocine était dès lors plus diluée que dans le cas d'utilisation de la bactériocine pure de *Bacillus subtilis* 168. Il faut considérer également que la bactériocine est probablement différente en termes de structure et d'action (Paik et al., 1998; Khochamit et al., 2015).

Un écart important concernant les dimensions des zones d'inhibition mesurées, pour *Aeromonas salmonicida*, existe également, avec une zone d'inhibition presque six fois supérieure pour LR1 comparé à VSG1. (Giri et al., 2012; Banerjee et al., 2017). Cette différence peut, comme précédemment, être expliquée par la méthodologie utilisée pour la manipulation. Dans le cas présent, on peut s'intéresser au milieu de culture utilisé et au temps d'incubation, tous deux différents pour ces expériences. Pour LR1, l'incubation fut réalisée dans un bouillon de type Luria, durant 14h à 32°C (Banerjee et al., 2017). Dans le cas

de VSG1, il s'agissait d'un bouillon de soja tryptophane, durant 12h à 35°C (Giri et al., 2012). On peut supposer que ces variables ont pu avoir un impact sur les substances produites, voire leur activité.

Tableau IV. Inhibition de divers agents bactériens par des souches de *Bacillus subtilis*

	ATCC6633	C3	168	VSG1	SG4	GC-21	GC-22	LR1	KKU213	BHI344	AP254
<i>Bacillus megaterium</i>	/	/	>200 mm	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Bacillus cereus</i>	/	/	<60 mm	/	/	/	/	/	10-20 mm	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	/	/	Entre 60 et 100 mm	/	/	/	/	/	10-20 mm	/	/
<i>Aeromonas hydrophila</i>	10 mm	/	/	Entre 5 et 7 mm	3.16±0.64 mm	4,28 mm	5,55 mm	8 mm	0 mm	15.2 ± 0.6 mm	< 5 mm
<i>Vibrio harveyi</i>	/	0 mm	/	Entre 2 et 5 mm	/	/	/	/	/	/	/
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7 mm	/	/	/	5.90±3.37 mm	/	/	10 mm	/	0 mm	/
<i>Aeromonas salmonicida</i>	/			Entre 2 et 5 mm	/	/	/	15 mm	/	/	/
<i>Aeromonas punctata</i>	/	/	/	/	/	4,55 mm	5,80 mm	/	/	/	/
<i>Edwarsiella tarda</i>	/	/	/	/	3.8±1.27 mm	/	/	/	/	6.1 ± 0.3 mm	< 5 mm
<i>Edwarsiella ictaluri</i>	/	/	/	/	/	4,93 mm	5,43 mm	/	/	/	5-10 mm
Références	Aly et al., 2008	Petit et al., 2024	Paik et al., 1998	Giri et al., 2012	Ghosh et al., 2007	Guo et al., 2016	Guo et al., 2016	Banerjee et al., 2017	Khochamit et al., 2015	Luo et al., 2014	Ran et al., 2012

Agents bactériens pour lesquels différentes souches de *Bacillus subtilis* ont montré une inhibition, et comparaison des tailles de zones d'inhibition mesurées.

### **3. Mécanismes mis en œuvre par *Bacillus subtilis* in vivo sur le Tilapia du Nil.**

Différentes études évoquées dans ce travail ont été réalisés sur le Tilapia du Nil afin d'étudier l'effet de diverses souches de *Bacillus subtilis* en ce qui concerne la résistance aux pathogènes et au stress ainsi que l'immunité. D'autres aspects de ces études, visant la croissance, la digestion, l'activité enzymatique au niveau digestif et la qualité de l'eau, ne font pas l'objet du présent travail. Les informations principales concernant les études utilisées dans ce chapitre sont reprises dans le tableau V ci-dessous.

Tableau V. Etudes de *Bacillus subtilis* chez le Tilapia du Nil

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, HSP70, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ et IFN- $\gamma$ significativement augmenté pour BS8. L'activité de la superoxyde dismutase, myéloperoxydase, taux de survie significativement augmentées pour BS8 et BS7	Won et al., 2020

<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
<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 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'ammoniac	Valeurs du lysozyme, complément, l'interleukine- 10 (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> .	Liao et al., 2023
<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</i> <i>agalactiae</i> (injection intra- péritonéale 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. Accroissement du taux de survie pour le groupe traité, de 15% (contrôle) à 60%.	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 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
<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 et légèrement plus important que pour celui traité aux antibiotiques (probiotique : 90% ;antibiotiques : 80%). 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

### 3.1. Effets sur l'immunité innée

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

Le microbiote joue un rôle très important dans le contrôle des réponses immunitaires innées de l'hôte. Il contribue au recrutement des leucocytes tels que des neutrophiles. Il intervient dans les voies de signalisation en augmentant le NF- $\kappa$ B ainsi qu'en augmentant l'expression de gènes liés à l'inflammation. (Yu et al., 2021).

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. 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 une paroi faite de 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. Composants de l'immunité innée et mécanismes d'autoprotection de *Bacillus subtilis*

En ce qui concerne l'immunité, un certain 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.

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 par 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. Certaines souches de *Bacillus subtilis* possèdent 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).

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  $1 \times 10^8$  UFC/g, il semble que les taux d'activité de ces enzymes soient accrus de manière significative. La supplémentation de ce même taux a permis un accroissement significatif des valeurs d'interleukine- $1\beta$  et du tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Ces deux molécules sont impliquées dans les réponses immunitaires innées et en sont donc des indicateurs (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 (Aly et al., 2008).

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 effectué, cette fois-ci non pas en utilisant un micro-organisme mais en jouant sur la concentration en ammoniac dans l'eau a établi que, quelles que soient les conditions de concentration en ammoniac dans l'eau, l'utilisation du probiotique permettait de diminuer la valeur de la malondialdéhyde, une molécule qui indique le niveau de stress oxydatif. Il a aussi été constaté 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* étant une bactérie douée de la capacité de sporuler, des chercheurs ont mené une étude en utilisant des spores de deux souches différentes. Avant de lancer l'étude visant à montrer l'effet sur le Tilapia de l'utilisation de spores de deux souches de *Bacillus subtilis*, les auteurs ont cherché ces souches au sein même du tube digestif des poissons. Aucune des deux souches n'a pu y être détectée. Les mesures de quantification du lysozyme (enzyme dont les bienfaits ont été mentionnés ci-dessus) réalisées à plusieurs reprises au cours de l'étude, ont montré 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) en utilisant la souche ATCC 6633, où 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. Effets sur l'immunité adaptative

Il a été décrit précédemment dans les études (tableau V) que certaines cytokines telles que l'interleukine 10 (IL-10), l'interleukine 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  étaient régulées à la hausse (Won et al., 2020; Liao et al., 2023). Ces cytokines sont produites aussi bien par des cellules de l'immunité innée (neutrophiles, macrophages, ...) que de l'immunité adaptative (lymphocytes B et T) (Kany et al., 2019; Won et al., 2020). Par exemple, l'IL-10, qui joue un rôle anti- et pro-inflammatoire, est produite par différents variants de lymphocytes T, notamment les lymphocytes T régulateurs. Les lymphocytes T CD8 voient leurs capacités de destruction accrues par la présence de cette cytokine. Il en va de même pour les lymphocytes B dont la production d'anticorps est augmentée (Bedke et al., 2019). La supplémentation en *Bacillus subtilis* a donc un impact positif potentiel sur l'immunité adaptative.

### 3.3. 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*, supplémentés ou non en *Bacillus subtilis*, était comparable (Xia et al., 2020). Une seconde étude sur 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* (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 - (le pourcentage de mortalité dans le groupe traité/ le pourcentage de mortalité dans le groupe contrôle) x 100 ». 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). La supplémentation en *Bacillus subtilis* WB60 a augmenté la résistance des individus face à *Aeromonas hydrophila*. 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 d'*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 (Won et al., 2020). Une autre étude a comparé l'impact de *Bacillus subtilis* QST713 avec celui du 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*. Au vu des 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).

Il a également été relevé que, lors de tests réalisés à partir de certains pathogènes, l'inoculation est pratiquée par injection intra-péritonéale : en ce cas, le tractus digestif étant contourné, il n'est pas tenu compte de la compétition possible 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 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 *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 ont montré que *Bacillus subtilis* permet l'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 du probiotique. (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. La conclusion de l'étude montre l'utilisation du probiotiques a permis, dans des conditions de haute densité, d'améliorer les paramètres de l'immunité innée. Cependant, en condition de basse densité, aucune différence n'est observée entre le groupe supplémenté et le groupe contrôle, notamment pour l'activité du lysozyme. Peut-on réellement attribuer cette stimulation de l'immunité innée à l'utilisation de *Bacillus subtilis* où cela résulte-t-il simplement du fait qu'il ait permis de contrer les effets négatifs du stress dans les conditions de densité élevée. On peut en effet envisager que, dans un environnement stressant comme celui d'une forte densité, *Bacillus subtilis* joue un rôle modulateur, en maintenant l'immunité innée à un niveau comparable à celui observé en condition optimale (basse densité). 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).

### 3.4. 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 de Liu et al., (2017),  $10^8$ CFU/g d'aliment. Les résultats (tableau VI) montrent que la dose retrouvée dans l'intestin est inférieure à celle administrée. Cependant celle-ci tant 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.

Tableau VI. Persistance dans l'intestin de *Bacillus subtilis* après ingestion

Mesures après x semaines	2	4	8
Dose	$1,02 \times 10^7$ UFC/g	$1,07 \times 10^7$ UFC/g	$1,89 \times 10^7$ UFC/g

Valeurs de *Bacillus subtilis* dans l'intestin mesurée à 2, 4 et 8 semaines (Liu et al., 2017).

### 3.5. 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. Les études de Liu et al. (2017), et Aly et al. (2008), ont permis de



démontrer que pour certains paramètres tels que le lysozyme, la production d'espèces réactives de l'oxygène, la capacité anti-oxydante totale (T-AOC) ou encore l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), sont influencés par le temps d'exposition aux probiotiques (figure 12). 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 un mois et ce suite au challenge test réalisé pour *Streptococcus iniae*, *Aeromonas hydrophila* et *Pseudomonas fluorescens* (tableau VII) (Aly et al., 2008).

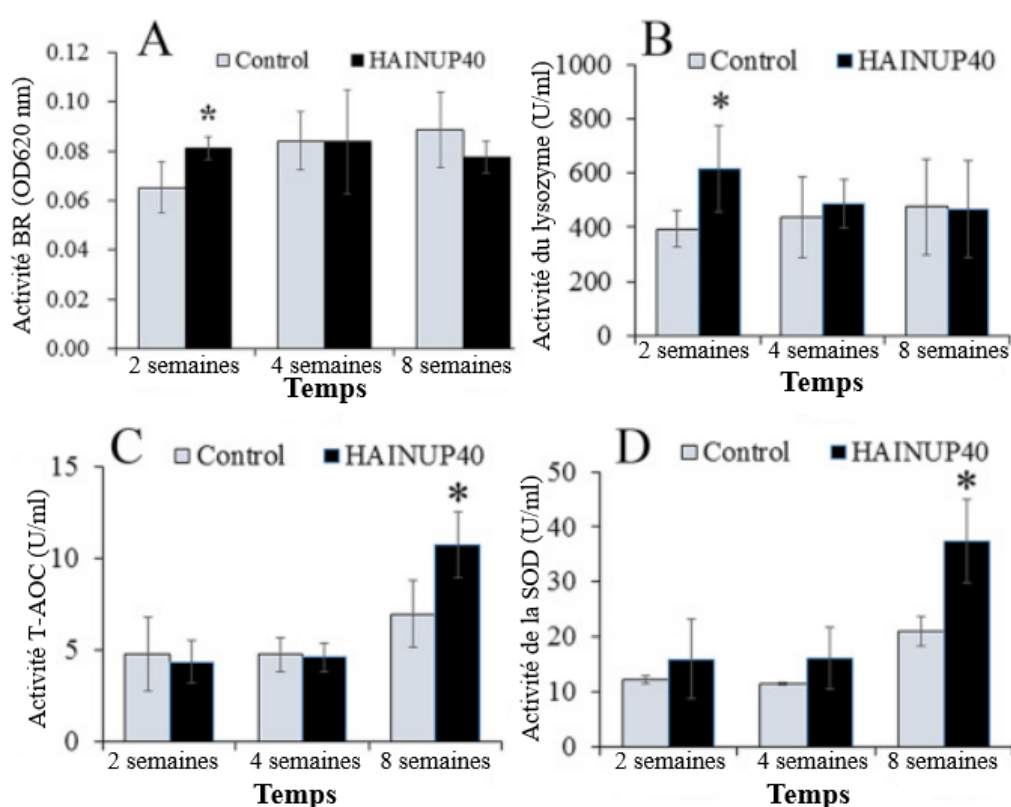


Figure 12. Valeurs de l'activité du « burst respiratoire » (BR), de l'activité du lysozyme, de « la capacité antioxydante totale » (T-AOC) et de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), mesurée à 2, 4 et 8 semaines, pour le groupe contrôle et le groupe supplémenté en *Bacillus subtilis* HAINUP40 (Liu et al., 2017).

Tableau VII. Taux de protection de probiotiques face à divers agents bactériens

Groupe	Un mois (%)			Deux mois (%)		
	<i>A.hydrophila</i>	<i>P.fluorescens</i>	<i>S.iniae</i>	<i>A.hydrophila</i>	<i>P.fluorescens</i>	<i>S.iniae</i>
<b><i>B. subtilis</i> et <i>L. acidophilus</i></b>	36.84 ± 3.83	36.96 ± 1.91	32.88 ± 5.24	52.01 ± 4.79	51.18 ± 5.85	40.56 ± 8.77
<b><i>B.subtilis</i></b>	27.53 ± 3.78	31.06 ± 6.5	20.52 ± 5.89	48.32 ± 4.66	43.16 ± 5.55	26.86 ± 12.89

Taux de protection pour la combinaison de *Bacillus subtilis* et *Lactobacillus acidophilus* et *Bacillus subtilis* seul, face à *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* et *Streptococcus iniae* après un et deux mois de supplémentation en probiotique.

### 3.6. 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 (tableau VIII). C'est le cas pour Aly et al., (2008) et Addo et al., (2017). L'association de diverses souches de *Bacillus subtilis* entre elles, voire avec d'autres espèces bactériennes, semble avoir un impact positif avec une stimulation accrue de l'immunité innée et de la défense contre certains pathogènes. Il existe potentiellement une synergie entre ces bactéries.

Tableau VIII. Effets de l'associations de probiotiques

Bactéries associées	Effets bénéfiques	Référence
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 et <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Taux de survie accru par l'association par rapport à <i>Bacillus subtilis</i> seul (96% pour l'association et 88% pour <i>Bacillus subtilis</i> seul)	Aly et al., 2008
<i>Bacillus subtilis</i> SB3056 et SB3615	Stimulation accrue de l'activité du lysozyme et de l'activité bactéricide du sérum. Absence de différence pour la résistance face à <i>Streptococcus iniae</i>	Addo et al., 2017

Association de diverses bactéries à potentiel probiotique et les effets observés (Aly et al., 2008; Addo et al., 2017).

## 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. On a en effet observé, après une supplémentation durant 8 semaines de *Bacillus subtilis* HAINUP40, une augmentation significative du poids final des poissons ainsi que du taux de conversion alimentaire. La production d'enzymes digestives a également été impactée positivement, avec une augmentation significative de la production d'amylase et de protéase après cette supplémentation. Les effets ne sont donc pas uniquement présents au niveau immunitaire mais bien sur 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. Au contraire de l'administration de HAINUP 40, l'administration de *Bacillus subtilis* B10 n'a pas montré les effets susmentionnés (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, dans la mesure où elles traitent de souches de *Bacillus subtilis* différentes, ce qui toutefois permet de noter la diversité des souches existantes et le fait que toutes n'ont pas le même potentiel d'efficacité. Par ailleurs, les conditions dans lesquelles les études sont menées peuvent différer, notamment concernant les systèmes de maintien de la qualité de l'eau ou la densité de population. 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 s'est distinguée en l'appliquant directement dans l'eau. Les dosages et temps d'administration n'étaient pas toujours identiques non plus. Si on reprend l'exemple ci-dessus, *Bacillus subtilis* 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).

Le mode de conservation des probiotiques est un point important. Des analyses sur des aliments conservés à deux températures différentes ont été réalisées et ont établi 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).

Au vu de tous ces éléments, il est normal d'observer des différences entre ces études et donc au niveau des résultats.

Bien que de nombreuses études soient menées dans ce domaine, on peut 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 d'évaluer leur intérêt pour ces probiotiques, et de manière plus globale certains éléments de l'aquaculture. Au total, 7 pisciculteurs, soit 17,5% des entreprises interrogées, ont répondu au questionnaire soumis.

Le problème principal revenu le plus fréquemment dans les réponses est l'atteinte des poissons par des maladies. D'autres éleveurs ont mentionné également le coût élevé de l'alimentation, la mauvaise qualité de l'eau, ainsi que la prédation (figure 13).

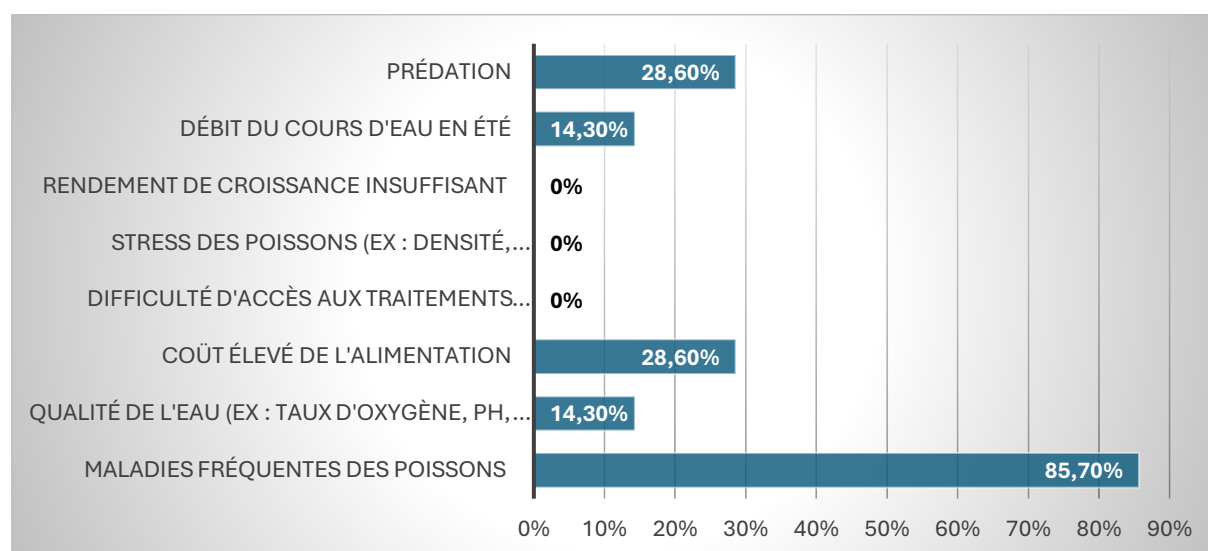


Figure 13. Identification des principaux problèmes rencontrés dans l'élevage aquacole wallon (n=7).

Divers moyens sont utilisés actuellement afin de lutter contre les problèmes susmentionnés (tableau IX)

Tableau IX. Moyens de lutte énoncés par les répondants

Moyens de lutte
Antiparasitaires
Balnéation
Antibiotiques
Contrôle de la provenance des poissons
Chaulage des étangs
Stamping out

Concernant de manière plus spécifique la question des probiotiques, un peu plus de la moitié en connaissent l'usage en aquaculture (figure 14). 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.

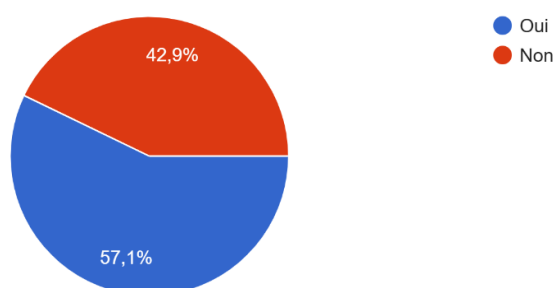


Figure 14. Connaissance de l'usage des probiotiques en aquaculture (n=7).

Les raisons mentionnées pour expliquer l'absence d'utilisation de ces probiotiques sont reprises dans la figure 15. La disponibilité et le manque d'informations sont les éléments principaux.

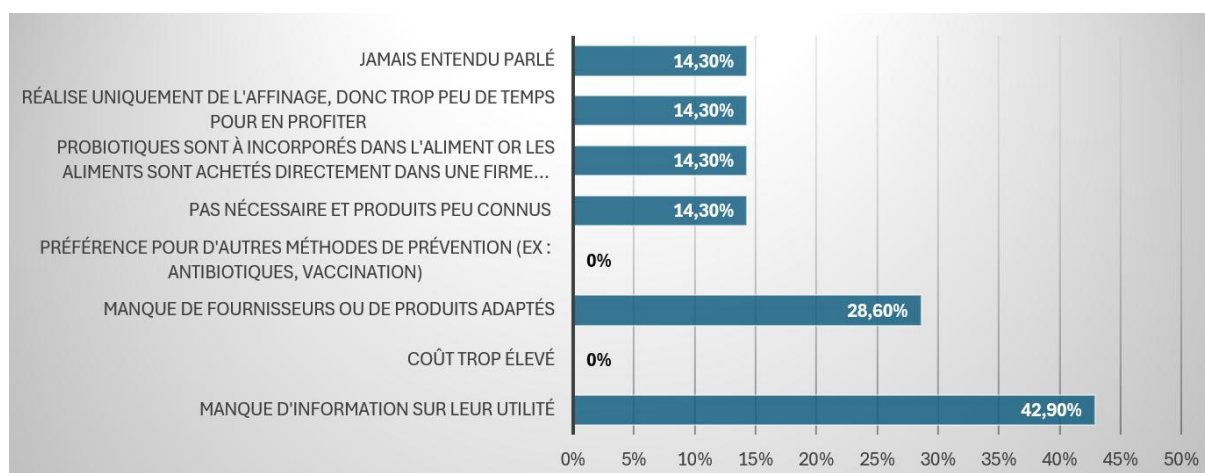


Figure 15. Raisons de la non-utilisation des probiotiques (n=7).

Plus de quarante pourcents des répondants jugent comme étant moyen l'intérêt des probiotiques (figure 16)

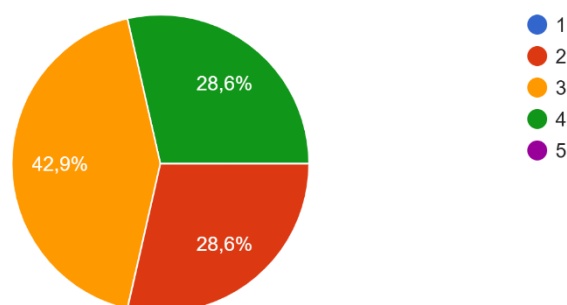


Figure 16. Evaluation de l'intérêt potentiel de l'usage des probiotiques en aquaculture (n=7) (1 = aucun intérêt, 5 = très intéressant)

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 17). 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 18).

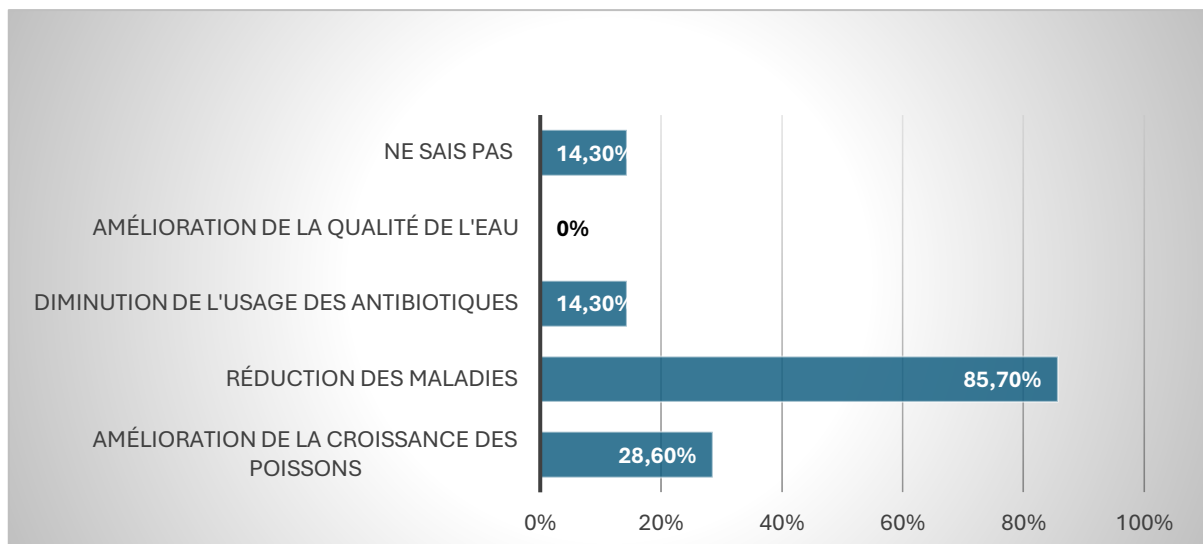


Figure 17. Bénéfices attendus par les éleveurs de l'utilisation des probiotiques (n=7).

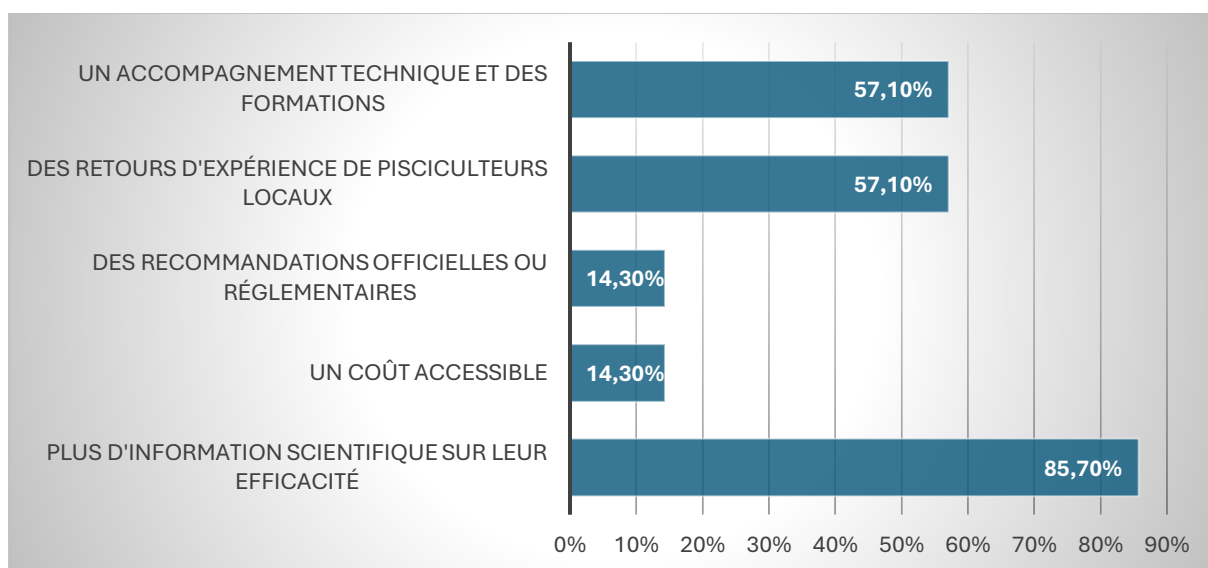


Figure 18. Éléments qui encourageraient les éleveurs à utiliser les probiotiques (n=7).

La majorité des répondants seraient intéressés par une formation traitant de ce sujet (figure 19).

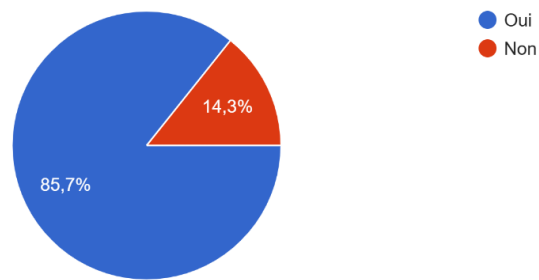


Figure 19. Intérêt porté par les éleveurs concernant le fait de recevoir une présentation ou une formation sur l'usage des probiotiques en aquaculture (n=7).

On note donc, chez une notable majorité de ces répondants, un intérêt de disposer de meilleures connaissances de ces probiotiques et 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 de ce travail 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. Déclaration d'utilisation de l'IA générative et des technologies assistées par l'IA dans le processus de rédaction

Je déclare avoir eu recours, de manière limitée, à l'IA afin de réaliser des corrections orthographiques, grammaticales ou encore de syntaxe.

## 7. 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
- Bauer, R., Dicks, L.M.T., 2005. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *International Journal of Food Microbiology* 101, 201–216. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.007
- Bedke, T., Muscate, F., Soukou, S., Gagliani, N., Huber, S., 2019. IL-10-producing T cells and their dual functions. *Seminars in Immunology*, Interleukin-10 “The surprising twists and turns of an anti-inflammatory cytokine on its way to the clinic” 44, 101335. doi:10.1016/j.smim.2019.101335
- 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
- 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
- Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C., 2007. Isolation of Putative Probiotics from the Intestines of Indian Major Carps.

Giri, S.S., Sukumaran, V., Dangi, N.K., 2012. Characteristics of Bacterial Isolates from the Gut of Freshwater Fish, *Labeo rohita* that May be Useful as Potential Probiotic Bacteria. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 4, 238–242. doi:10.1007/s12602-012-9119-6

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

Guo, X., Chen, D.-D., Peng, K.-S., Cui, Z.-W., Zhang, X.-J., Li, S., Zhang, Y.-A., 2016. Identification and characterization of *Bacillus subtilis* from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) for use as probiotic additives in aquatic feed. *Fish & Shellfish Immunology* 52, 74–84. doi:10.1016/j.fsi.2016.03.017

Gutiérrez-Chávez, C., Benaud, N., Ferrari, B.C., 2021. The ecological roles of microbial lipopeptides: Where are we going? *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19, 1400–1413. doi:10.1016/j.csbj.2021.02.017

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

Kany, S., Vollrath, J.T., Relja, B., 2019. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci* 20, 6008. doi:10.3390/ijms20236008

Khochamit, N., Siripornadulsil, S., Sukon, P., Siripornadulsil, W., 2015. Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: Potential as a probiotic strain. *Microbiological Research* 170, 36–50. doi:10.1016/j.micres.2014.09.004

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

Luo, Z., Bai, X., Chen, C., 2014. Integrated application of two different screening strategies to select potential probiotics from the gut of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Fish Sci* 80, 1269–1275. doi:10.1007/s12562-014-0794-y

Mercado, V., Olmos, J., 2022. Bacteriocin Production by *Bacillus* Species: Isolation, Characterization, and Application. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 14, 1151–1169. doi:10.1007/s12602-022-09966-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

Naveed, M., Wang, Y., Yin, X., Chan, M.W.H., Aslam, S., Wang, F., Xu, B., Ullah, A., 2023. Purification, Characterization and Bactericidal Action of Lysozyme, Isolated from *Bacillus subtilis* BSN314: A Disintegrating Effect of Lysozyme on Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Molecules* 28, 1058. doi:10.3390/molecules28031058

Nayak, A., Harshitha, M., Disha, S., Dubey, S., Munang'andu, H.M., Evensen, Ø., Karunasagar, I., Chakraborty, A., Maiti, B., 2023. *In vitro* determination of probiotic efficacy of *Bacillus subtilis* TLDK301120C24 isolated from tilapia against warm water fish pathogens and *in vivo* validation using gnotobiotic zebrafish model. *Microbial Pathogenesis* 185, 106429. doi:10.1016/j.micpath.2023.106429

Nayak, A., Harshitha, M., Dubey, S., Munang'andu, H.M., Chakraborty, A., Karunasagar, I., Maiti, B., 2024. Evaluation of Probiotic Efficacy of *Bacillus subtilis* RODK28110C3 Against Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* Using In Vitro Studies and In Vivo Gnotobiotic Zebrafish Gut Model System. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 16, 1623–1637. doi:10.1007/s12602-023-10127-w

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

- Paik, S.H., Chakicherla, A., Hansen, J.N., 1998. Identification and Characterization of the Structural and Transporter Genes for, and the Chemical and Biological Properties of, Sublancin 168, a Novel Lantibiotic Produced by *Bacillus subtilis* 168\*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 23134–23142. doi:10.1074/jbc.273.36.23134
- Parisot, J., Carey, S., Breukink, E., Chan, W.C., Narbad, A., Bonev, B., 2008. Molecular Mechanism of Target Recognition by Subtilin, a Class I Lanthionine Antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 612–618. doi:10.1128/aac.00836-07
- 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
- Ran, C., Carrias, A., Williams, M.A., Capps, N., Dan, B.C.T., Newton, J.C., Kloepper, J.W., Ooi, E.L., Browdy, C.L., Terhune, J.S., Liles, M.R., 2012. Identification of *Bacillus* Strains for Biological Control of Catfish Pathogens. *PLoS One* 7, e45793. doi:10.1371/journal.pone.0045793
- 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
- Shelburne, C.E., An, F.Y., Dholpe, V., Ramamoorthy, A., Lopatin, D.E., Lantz, M.S., 2007. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, 297–300. doi:10.1093/jac/dkl495
- Soltani, M., Ghosh, Koushik, Hoseinifar, Seyed Hossein, Kumar, Vikash, Lymbery, Alan J., Roy, Suvra, and Ringø, E., 2019. Genus *Bacillus*, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 27, 331–379. doi:10.1080/23308249.2019.1597010
- 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
- Yu, Y.-Y., Ding, L.-G., Huang, Z.-Y., Xu, H.-Y., Xu, Z., 2021. Commensal bacteria-immunity crosstalk shapes mucosal homeostasis in teleost fish. *Reviews in Aquaculture* 13, 2322–2343. doi:10.1111/raq.12570
- 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., 2025a. 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
- Zhou, Z., Xiang, L., Wang, X., Jiang, G., Cheng, J., Cao, X., Fan, X., Shen, H., 2025b. 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