

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer de l'Aménagement du Littoral



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME
D'INGENIEUR ET MASTER EN SCIENCES DE LA MER

OPTION: BIOTECHNOLOGIE MARINE

Thème :

Etude du potentiel probiotique de bactéries à Gram négatif isolées à partir d'échantillons aquatiques

Présenté par :

BENABDOUN Inès & BENHALLA Inès Lina

Soutenu le 17/12/2020 devant la commission du jury

Mme. CHAOU N.	Maitre assistante A	(ENSSMAL)	Présidente
Mr.KADA M.	Maitre-assistant A	(ENSSMAL)	Examineur
Mme.DJAHNIT N.	Maitre-assistante B	(ENSSMAL)	Examinatrice
Mme.ALOUACHE S.	Maitre de conférences A	(ENSSMAL)	Promotrice
Mme. BOUACHA C.	Doctorante	(ENSSMAL)	Co-Promotrice

Promotion : 2019-2020

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu de nous avoir accordé la santé et les moyens de réaliser ce travail.

*Nous tenons à remercier notre encadreur **Madame ALOUACHE S.** maître de conférences à l'ENSSMAL qui a accepté de nous encadrer nous la remercions infiniment pour son aide, ses orientations, ses conseils précieux et sa patience. Et **Madame BOUACHA C.** qui a accepté de codiriger notre travail, nous la remercions pour son aide ainsi que ses orientations et conseils.*

*Nous remercions vivement **Mme DJAHNIT N.** et **Mr KADA M.** d'avoir accepté d'examiner ce travail, **Mme CHAOU N.** pour nous 'avoir honorés de présider ce jury.*

*Ce travail a été rendu possible grâce au soutien qui nous a été accordé par l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral (ENSSMAL). Au niveau des laboratoires, Nous voudrions remercier tout le personnel de L'ENSSMAL et particulièrement les ingénieurs de laboratoire : Monsieur **DJERAI NourEdinne**, madame **REFES Nadia** et Monsieur **MATOUK Youcef** pour leur précieuse aide et leurs caractères humains,*

Un grand merci à nos parents qui nous ont soutenues, encouragées et aidées tout au long de notre cursus.

Tables des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

INTRODUCTION	2
CHAPITRE I: GENERALITES	4
I.1 Les probiotiques	5
I.1.1 Historique et définition.....	5
I.1.2 Souches utilisées comme probiotiques.....	6
I.1.3 Critères de sélection des souches probiotiques.....	6
I.1.3.1 Critères fonctionnels	6
I.1.3.2 Critères de sécurité.....	7
I.1.3.3 Critères technologiques.....	8
I.1.4 Mécanismes d'action des probiotiques:.....	8
I.1.4.1 Concurrence pour les nutriments	8
I.1.4.2 Antagonisme direct	9
I.1.4.3 Concurrence pour les fixations	9
I.1.4.4 Renforcement des jonctions serrées	9
I.1.4.5 Action sur le système immunitaire.....	9
I.1.5 Production industrielle:	10
<input type="checkbox"/> Conservation des souches.....	10
<input type="checkbox"/> Préparation de l'inoculum.....	11
<input type="checkbox"/> Production en fermenteur	11
<input type="checkbox"/> Centrifugation.....	11
<input type="checkbox"/> Lyophilisation.....	11
<input type="checkbox"/> Broyage/mélange	11
<input type="checkbox"/> Commercialisation.....	11
I.1.6 Utilisations des probiotiques	13
I.1.6.1 Applications chez l'homme	13
I.1.6.2 Applications chez l'animal.....	14
I.1.7 Les probiotiques en aquaculture:.....	15
I.1.7.1 Évaluation des probiotiques en aquaculture.....	15
I.1.7.2 Différentes applications des probiotiques en aquaculture:.....	16
I.1.7.3 Utilisation dans l'amélioration de la production aquacole:.....	17

I.1.7.4	Utilisation dans le traitement et l'amélioration de la qualité des eaux:.....	20
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES.....		21
II.1	Matériel biologique.....	22
II.2	Méthodes	23
II.2.1	Echantillonnage et isolement des bactéries	23
II.2.2	Identification	25
II.2.2.1	Caractères morphologiques.....	25
II.2.2.1.1	Aspect macroscopique	25
II.2.2.1.2	Aspect microscopique (coloration de gram).....	25
II.2.2.2	Caractère enzymatique (Test d'oxydase).....	26
II.2.2.3	Identification biochimique par la galerie API 20 E (BioMérieux, France).....	26
II.2.3	Le test du pouvoir antagoniste par la méthode des puits	27
II.2.4	Test de production de biofilm	28
II.2.5	Test d'antibio-résistance	29
II.2.6	Test d'hémolyse	30
II.2.7	Test de la résistance au pH gastrique	30
II.2.8	Test de la résistance aux sels biliaires	30
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION.....		31
III.1	Isolement et identification:	32
III.2	Test d'antagonisme.....	36
III.3	Test de production de biofilm.....	38
III.4	Antibiogramme.....	40
III.5	Test d'hémolyse	43
III.6	Test de résistance au pH gastrique et aux sels biliaires	43
III.6.1	Résistance au pH.....	44
III.6.2	Résistance aux sels biliaires.....	45
CONCLUSION.....		47
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES.....		49

LISTE DES ABREVIATIONS

FAO: Food and Agriculture organization

OMS: Organisation mondiale de la Santé

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique

QSP: Qualified Presumption of Safety

GRAS: Generally Recognized As Safe

BSH: Bile Salt Hydrolase

pH: potentiel Hydrogène

PRRs: Pattern Recognition Receptors

PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns

TLR: Toll Like Receptors

TCD4: Lymphocytes T auxilliaires (T helper)

TCD8: Lymphocytes T cytotoxiques (T killer)

IgA: Immunoglobuline A

Th1/Th2: Types de lymphocytes T auxilliaires différenciés

IL2: Interleukine 2

TNF- α : Cachectine/Facteur de nécrose tumorle alpha

LB: Lymphocytes B

PCR: Polymerase Chain Reaction

MRS: Gélose de Man, Rogosa, Sharpe

BHI: Brain Heart Infusion

PDA: N-diméthyl Paraphénylène Diamine

API: Appareils et Procédés d'Identification

TE: Tetracycline

FOX: Céfoxitine

OX: Oxacilline

ADH: Arginine Dihydrolase

LDC: Lysine Decarboxylase

ODC: Ornithine Décarboxylase

H2S: Production d'hydrogène sulfuré

URE: Uréase

TDA: Tryptophane Désaminase

IND: Production d'indole
VP: Production d'acétoïne (Voges-Proskauer)
GLU: Glucose
MAN: Mannitol
INO: Inositol
RHA: Rhamnose
SAC: Saccharose
MEL: Mélibiose
AMY: Amygdaline
ARA: Arabinose
ONPG: Orthonitrophényl-bêta D-galactopyranoside
GEL: Synthèse de gélatinase
PBS: Phosphate Buffered Saline
DO: Densité Optique
MH: Mueller Hinton
AX: Amoxicilline
ATM: Aztréonam
CAZ: Céfotazidime
AK: Amikacine
SXT: Triméthoprim + sulfaméthoxazole
CN: Gentamicine
TMP: Triméthoprim
AN: Amikacine
CIP: Ciprofloxacine
CD: Clindomycine
LPS: Lipopolysaccharides
UFC: Unités formant colonie
BHIA: Brain Heart Infusion Agar

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les mécanismes d'action des probiotiques.....	8
Figure 2: Les différentes étapes de production.	10
Figure 3: Evaluation in vivo et in vitro de l'effet du potentiel candidat probiotique.	16
Figure 4: Les différentes étapes d'isolement des bactéries à partir du tube digestif de <i>S. officinalis</i>	24
Figure 5: Galerie API 20E.....	26
Figure 6: Schéma représentant la méthode de détection de l'antagonisme bactérien par puits	28
Figure 8: Illustration d'une observation microscopique d'une souche à Gram négatif (<i>Pseudo2</i>) après coloration de Gram (Gx 100X)	32
Figure 7: Photo représentative de la méthode suivie lors du test de production de biofilm.....	29
Figure 9: Résultat positif de l'oxydase chez l'une des souches testées.....	33
Figure 10: Illustration du profil biochimique de la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
Figure 11: Illustration des résultats du test d'antagonisme sur les souches testées.....	38
Figure 12: Résultats du test de production de biofilm pour les souches isolées.....	39
Figure 13: Illustration des résultats du test d'antibiorésistance de la souche <i>P. aeruginosa</i> (<i>Pseudo 2</i>)	42
Figure 14: Résultats de l'effet du pH après 3h d'incubation par mesure de la densité optique.....	44
Figure 15: Résultats de l'effet du pH après 3h d'incubation par dénombrement.	44
Figure 16: Résultats de l'effet des sels biliaries (0.3%oxgall) sur les souches testées, estimé par le suivi de la densité optique.	45
Figure 17: Résultats de l'effet des sels biliaries (0.3%oxgall) sur les souches testées, estimé par le suivi de la charge microbienne.	45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les micro-organismes utilisés comme probiotiques.	6
Tableau 2: Souches probiotiques utilisées en aquaculture	17
Tableau 3: Liste des antibiotiques utilisés dans le test d'antibio-résistance	29
Tableau 4: Les résultats des différents tests de la Galerie biochimique API 20 E	34
Tableau 5: Résultat de l'identification des souches isolées	35
Tableau 6: Résultat du test d'antagonisme.....	36
Tableau 7: Résultat de l'antibiogramme	40
Tableau 8: Résultats du test d'hémolyse.....	42

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les bactéries représentent les agents biologiques primaires maintenant le bon fonctionnement du monde. Leur nombre total serait estimé à 5 millions de trillion de trillion (5×10^{30} de cellules). Les bactéries auxquelles nous nous intéressons sont des bactéries dites symbiotiques ou les bonnes bactéries, elles exercent un effet bénéfique comme c'est le cas des bactéries présentes dans le tractus gastro-intestinal (REID, 2020), Celles-ci jouent un rôle sanitaire important en raison de leur implication dans les fonctions nutritionnelles, immunologiques et physiologiques (COLLADO et SANZ, 2009).

La perturbation de la flore microbienne à la suite d'un stress, changement d'alimentation, du vieillissement ou d'une prise d'antibiotiques engendre un déséquilibre de la flore tant en quantité qu'en diversité microbienne. C'est pourquoi ces dernières années de nombreux chercheurs se sont penchés sur l'idée de moduler de façon positive le microbiote, et cela grâce à l'administration de micro-organismes vivants appelés probiotiques (LARDEUR, 2018).

Bien que la définition de ces probiotiques soit en constante évolution, ils désignent essentiellement des microorganismes qui influencent favorablement la santé de l'hôte en améliorant la microflore indigène (DUGAS et al., 1999).

Cependant, pour qu'une souche identifiée ait le statut de probiotique, elle doit répondre à certains critères qui selon le groupe de travail de la FAO/OMS (2002), sont les suivants:

- Tests *in vitro*: résistance à l'acidité gastrique, aux sels biliaires et aux enzymes digestives ainsi que l'activité antimicrobienne contre les bactéries potentiellement pathogènes.
- Test de sécurité: preuve que la souche est sûre et sans contamination.
- Tests *in vivo* pour corroborer les allégations de santé sur l'hôte.

Ces probiotiques ont notamment prouvé leur efficacité en aquaculture. En effet, l'utilisation massive des antibiotiques et de la vaccination pour faire face aux maladies bactériennes a entraîné l'apparition de bactéries résistantes. Ces bactéries résistantes constituent une menace pour la santé humaine et l'environnement.

La réduction progressive de l'usage des antibiotiques a suscité un regain d'intérêt pour l'incorporation de telles souches microbiennes dans l'aliment, afin de maintenir l'effet bénéfique obtenu avec les antibiotiques (**GUILLOT, 1998**)

Le présent travail se focalise sur l'isolement et l'étude du potentiel probiotique de bactéries à Gram négatif provenant du tube digestif d'une espèce aquatique: *Sepia officinalis*.

Afin de traiter le sujet, nous avons d'abord effectué un isolement et une identification des bactéries, puis nous avons procédé aux :

- Tests de bioactivité : Antagonisme
- Test de formation de biofilm
- Tests de biosécurité. : Antibiogramme, hémolyse
- Test de résistance au pH et aux sels biliaires

CHAPITRE I: GENERALITES

I.1 Les probiotiques

I.1.1 Historique et définition

Depuis des centaines d'années, des personnes de cultures différentes consommaient des produits laitiers fermentés que l'on considérait comme une source de santé.

En 1908, le scientifique russe Elie Metchnikoff (lauréat du Prix Nobel et professeur à l'institut Pasteur à Paris) découvrit que la longévité des paysans bulgares est liée à la consommation de microorganismes vivants provenant des produits laitiers fermentés. La notion "bonnes bactéries" rendait le professeur perplexe, ce dernier voyait les microbes comme étant nuisibles à la santé humaine. Après plusieurs recherches le scientifique a affirmé que les bactéries produisant de l'acide lactique offraient des bénéfices pour la santé (**OZEN et DINLEYICI, 2015**).

A la même époque, en 1906, le pédiatre Henry Tissier isolé une bifidobactérie à partir d'un enfant nourri au sein qu'il nomma *Bacillus bifidus communis*. Le chercheur affirma que la bifidobactérie réduisait la quantité de *Clostridium difficile*, responsable de diarrhée et d'inflammation intestinale, il recommanda par la suite l'administration de bifidobactéries aux enfants souffrant de ce symptôme.

En 1920, le microbiologiste Français Henri Boulard a isolé une nouvelle souche de levure *Saccharomyces boulardii*.

En 1965, Lilly et Stillwell, définissaient les probiotiques comme des substances produites par des microorganismes stimulant la croissance d'autres microorganismes.

En 1998, Guarner et Schaafsma précisait que les probiotiques sont « des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte ».

Afin d'éviter toute dérive, la définition des probiotiques est officialisée en 2002 par la **FAO** (Food and Agriculture Organisation) et l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS**). La définition se base sur celle de Guarner et Schaafsma et est la suivante : « les probiotiques sont des micro-organismes vivants, qui lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte ».

I.1.2 Souches utilisées comme probiotiques

Les probiotiques sont également largement utilisés en aquaculture: bactérie à gram+, bactéries à gram -, microalgues et levures marines (HAI, 2015).

Les bactéries les plus utilisées comme probiotiques sont listées dans le tableau ci-dessous:

Tableau 1: Les micro-organismes utilisés comme probiotiques (RINGO, 2020).

Genre	Espèce
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. plantarum</i> et <i>L. rhamnosus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. sanguis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. salivarius</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. lactis</i> et <i>B. longum</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. vireti</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>A. media</i>
<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i>
<i>Clostridium</i>	<i>C. butyricum</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aestumarina</i>
<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>P. piscicida</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>

I.1.3 Critères de sélection des souches probiotiques

I.1.3.1 Critères fonctionnels

- **Activité antimicrobienne**

De nombreux métabolites bactériens (acides organiques, acides gras, peroxyde d'hydrogène, diacétyles) ont une action antibactérienne ; cette caractéristique est mesurée à travers l'inhibition de croissance de bactéries pathogènes : *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio sp.* (DUNNE et MAHONY, 2001 ; JACOBSEN et NIELSEN, 1999).

- **Adhésion aux cellules intestinales**

Ce critère est considéré comme une condition préalable à la colonisation (OUWEHAND et al., 1999). L'adhésion permettrait de prévenir l'implantation de pathogènes sur les cellules épithéliales intestinales *via* des mécanismes de compétition (ALEGRE, 2009).

- **Survie au cours du transit digestif**

Tout microorganisme probiotique doit avoir une tolérance aux conditions acides de l'estomac pour qu'il puisse survivre. La souche étudiée est cultivée, centrifugée puis lavée ; le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans un milieu de culture acidifié. Le dénombrement des bactéries ayant survécu donne une approximation sur la capacité de résistance de la souche à l'acidité (LARPENT et al., 1994).

- **Résistance aux sels biliaires**

Les acides biliaires sont synthétisés par le foie à partir du cholestérol et sont sécrétés au niveau du duodénum. Les microorganismes qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face aux sels biliaires libérés dans le duodénum.

Les BSH (Bile Salt Hydrolase) sont des enzymes intracellulaires qui catalysent l'hydrolyse des sels biliaires. La capacité des souches probiotiques à produire cette enzyme est considérée comme critère de sélection (ROY, 2006).

I.1.3.2 Critères de sécurité

- **Identification de la souche**

La détermination de la classification taxonomique par les méthodes phénotypiques et génotypiques est considérée comme la première étape de sélection des souches probiotiques. L'hybridation ADN-ADN et le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16s sont les plus utilisés. Les souches probiotiques doivent être déposées dans une collection internationale.

- **Innocuité**

Ce critère est important pour évaluer tout effet indésirable possible (activités métaboliques nocives, production de toxine, activité hémolytique, résistance aux antibiotiques).

Les souches probiotiques doivent posséder le statut **QSP** (Qualified Presumption of Safety) en Europe ou **GRAS** (Generally Recognized As Safe) aux Etats-Unis (**BARLOW et al., 2007; SANDERS et al., 2010**).

I.1.3.3 Critères technologiques

Les souches probiotiques doivent garder leurs caractéristiques durant les procédés de production. Le nombre minimal nécessaire pour exercer un effet probiotique est estimé à 10^8 cellules viables /g. Les produits doivent être conservés dans des conditions appropriées (**OUWEHAND et al., 1999**).

I.1.4 Mécanismes d'action des probiotiques:

Les mécanismes d'action des probiotiques assurant un effet bénéfique pour la santé sont multiples et plus souvent propres à la souche bactérienne. Ces probiotiques peuvent exercer plusieurs méthodes contre les bactéries pathogènes, ces mécanismes sont présentés dans la (**Figure 1**).

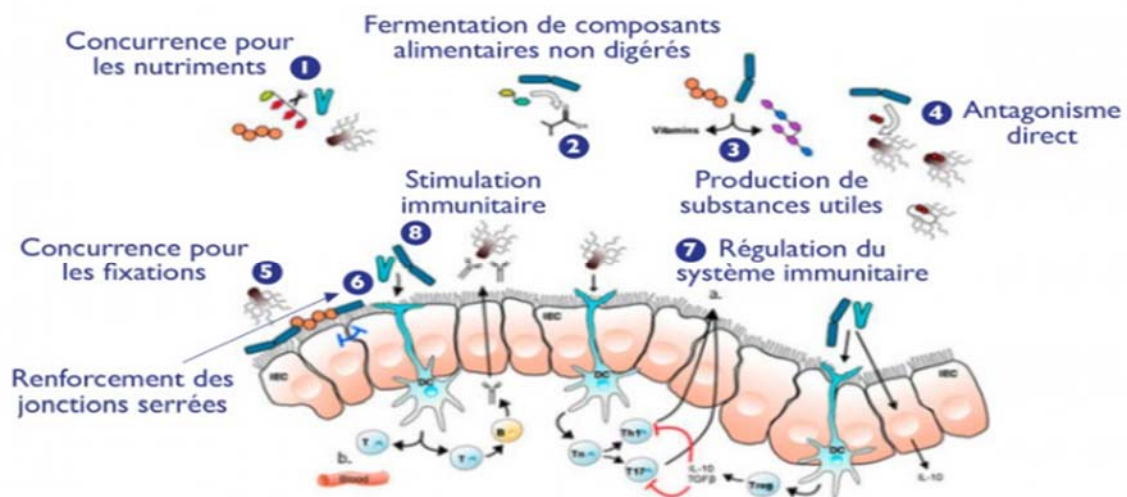


Figure 1: Les mécanismes d'action des probiotiques (**O'TOOLE et COONEY, 2008**).

I.1.4.1 Concurrence pour les nutriments

Le microbiote intestinal abrite plusieurs centaines d'espèces bactériennes: bactéries, virus, parasites et champignons non pathogènes; les probiotiques entrent en compétition avec ces

micro-organismes permettant de consommer les substrats nécessaires aux bactéries pathogènes (SHERMAN et al., 2009).

I.1.4.2 Antagonisme direct

Les probiotiques ont la capacité de produire des bactériocines définies majoritairement comme des protéines dotées d'une activité bactéricide mais aussi des produits de dégradation (acide lactique) qui vont abaisser le pH de l'intestin empêchant ainsi la prolifération de certaines bactéries pathogènes (MARTEAU et DORE, 2017).

I.1.4.3 Concurrence pour les fixations

Dans l'intestin sain, chaque microorganisme occupe une place où toutes les conditions nécessaires à sa survie sont réunies, qu'on appelle niche écologique.

Selon le principe d'exclusion compétitive « Dans un environnement stable, deux espèces utilisant les mêmes types de ressources, ne peuvent continuer à coexister, l'espèce la plus compétitive élimine l'autre ». Les probiotiques empêchent les bactéries pathogènes d'occuper les sites d'adhérence aux cellules épithéliales (WU et al., 2008).

Les probiotiques stimulent la sécrétion de mucines par les cellules caliciformes permettant d'obtenir une couche de mucus qui empêche la fixation des agents pathogènes aux cellules épithéliales. (MACK et al., 1999).

I.1.4.4 Renforcement des jonctions serrées

L'étanchéité de l'épithélium est assurée par les jonctions serrées. La claudine et l'occludine sont les protéines principales contribuant à la formation de ces jonctions.

Le microbiote intestinal et les probiotiques influencent la synthèse et le renforcement de ces protéines transmembranaires empêchant la diffusion paracellulaire de microorganismes pathogènes (SHERMAN et al., 2009).

I.1.4.5 Action sur le système immunitaire

Les probiotiques stimulent les récepteurs de l'immunité innée **PRRs** (Pattern Recognition Receptor), présents dans les cellules immunitaires et épithéliales et qui reconnaissent les motifs associés aux pathogènes **PAMPS** (Pathogen Associated Molecular Patterns). L'activation des **PRRs** notamment les **TLR** (Toll-like Receptors) qui sont les mieux caractérisés, induit la production de peptides antimicrobiens, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de polynucléaire neutrophiles et de macrophages (NG, et al., 2009).

Les probiotiques ont également un rôle dans :

- L'activation des lymphocytes TCD4+ et TCD8+.
- La sécrétion d'IgA spécifiques à l'antigène par les plasmocytes présents dans la *Lamina propria*.
- Répression de la réponse inflammatoire Th1 et la production de cytokines inflammatoires IL2 et TNF- α qui ont pour rôle:
 - IL2:
 - Stimule la prolifération des LB.
 - Stimule la prolifération des Th1
 - Limite la prolifération des Th2
 - TNF- α :
 - Stimule la transformation des monocytes en macrophages.
 - Inhibe les Th2.

I.1.5 Production industrielle:

La production industrielle de ferments probiotiques se déroule généralement selon une succession d'opérations unitaires schématisées ci-dessous :

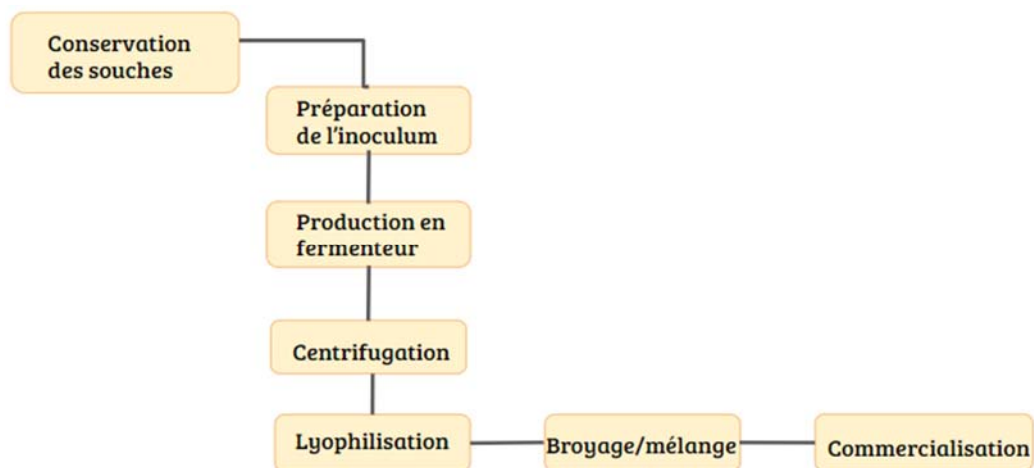


Figure 2: Les différentes étapes de production (Guillaume, 2012)

- **Conservation des souches**

La souche isolée est conservée à -80 degré afin de garantir l'ensemble de ses propriétés morphologiques, métaboliques, génétiques et physiologiques pendant une longue période.

Au début d'une nouvelle production, des cryotubes sont prélevés et décongelés, Un contrôle qualité sera effectué pour détecter les contaminations.

- **Préparation de l'inoculum**

Un milieu de culture favorable à la multiplication de la souche est préparé dans des conditions stériles. Ce milieu de culture doit contenir toutes les sources d'énergie : sucre, protéines, minéraux nécessaires à la croissance des bactéries.

- **Production en fermenteur**

Après avoir vérifié la pureté de l'inoculum, ce dernier sera transféré dans un bioréacteur avec régulation des paramètres de température, acidité, aération et agitation. On mesure le trouble du milieu de culture pour évaluer le nombre de bactéries.

- **Centrifugation**

Les bactéries vivantes sont séparées du milieu de culture par force centrifuge; ce qui va permettre d'augmenter la concentration des bactéries vivantes.

La biomasse récupérée se présente sous forme de "pâte bactérie très concentrée" qui subira un séchage en utilisant différents adjuvants pour préserver la viabilité bactérienne.

- **Lyophilisation**

Il s'agit d'une opération de déshydratation du produit à une température très basse et l'eau restante est éliminée par sublimation. Cette phase peut durer de un à trois jours.

- **Broyage/mélange**

Le lyophilisat obtenu est ensuite broyé afin d'obtenir une poudre fine et homogène. Chaque grain de poudre peut contenir jusqu'à 1 milliard de bactéries.

La poudre de bactéries peut être mélangée avec des excipients sous contrôle strict de la température et de l'humidité afin obtenir la formulation souhaitée.

- **Commercialisation**

Le produit final peut être commercialisé sous forme de poudre en vrac, de capsules, de sachets, de comprimés ou de flacons.

Les industriels doivent effectuer des contrôles stricts et répétés afin de s'assurer de l'innocuité des souches de micro-organismes utilisées.

Les probiotiques à usage humain notamment se présentent sous différentes formes. Dans les supermarchés, ils sont souvent vendus sous forme de produits laitiers contenant des «bactéries vivantes» et dans les magasins d'aliments naturels sous forme de capsules ou de comprimés

composés de préparations lyophilisées de bactéries qui favorisent «un intestin sain», etc. Un grand nombre de produits *Bacillus* sont utilisés comme «nouveaux aliments» ou comme compléments alimentaires avec diverses allégations de «renforcement» du bien-être de l'utilisateur, en restaurant la microflore naturelle dans l'intestin (**HONG et al 2005**).

En santé animale également, comme dans le cas de la nourriture pour chiens, il existe différentes formes par lesquelles les probiotiques sont administrés, nous citons:

- Les probiotiques déshydratés qui représentent la forme la plus répandue, c'est une poudre issue d'une lyophilisation à incorporer directement dans la nourriture.
- Les ferments frais sous forme liquide qui sont plus difficiles à trouver sur le marché mais représentent plus d'avantage. En effet, la solution contenant les probiotiques renferme de plus les produits de la fermentation (enzymes digestives, peptides bioactifs...) et présente un niveau d'activité élevé. (**MACOUZET, 2015**).

En aquaculture, différentes formes sont commercialisées sur le marché: granulaires, liquides, floconnées. Ces dernières, sont mises sur le marché par des entreprises telles que EPICORE qui propose une variété de produits destinés à l'aquaculture notamment issus de la biotechnologie contenant des probiotiques. Nous citons à titre d'exemple l'EPIFEED-LHF (Liquid Hatchery Feeds) qui est un aliment liquide pour larves d'écloserie qui fournissent une nutrition supérieure en écloserie et causent moins de problèmes de pollution que les aliments secs traditionnelle. (**EPICORE, 2020**)

Le groupe de travail de la **FAO/OMS** recommande dans ses "lignes directives pour l'évaluation des probiotiques dans les aliments" la description sur l'étiquette des produits probiotiques les informations suivantes:

- Désignation du genre, de l'espèce et de la souche probiotique. Cette désignation ne doit pas induire en erreur les consommateurs quant à la fonctionnalité de la souche
- Le nombre minimal viable de chaque souche à la fin de la durée de conservation
- Les allégations de santé
- Taille de portion suggérée, qui doit fournir la dose efficace de probiotiques liée à l'allégation de santé
- Conditions de stockage
- Coordonnées de l'entreprise pour l'information des consommateurs (**VANDENPLAS et al, 2015**)

I.1.6 Utilisations des probiotiques

I.1.6.1 Applications chez l'homme

En santé humaine, les applications des probiotiques ne cessent de se diversifier avec de nouvelles perspectives suivant le développement scientifique. Elles peuvent cibler à la fois des individus sains et malades puisque les effets recherchés peuvent être de nature préventive ou curative. L'objectif peut être de lutter contre la cause de la maladie ou des altérations métaboliques, ou d'atténuer les symptômes associés à la survenue ou à la progression d'une maladie ou d'une altération métabolique (VANDENPLAS *et al.*, 2015). Nous citerons ici quelques exemples de ces applications :

Les effets bénéfiques des probiotiques ont été démontrés dans le traitement des maladies gastro-intestinales tels que le syndrome du côlon irritable, la maladie inflammatoire de l'intestin (ISLAM, 2016), ainsi que la constipation chez l'enfant (TABBERS *et al.*, 2011) et chez l'adulte, à travers la modulation de production de cytokines dans l'intestin (SAUTER *et al.*, 2006) Certains probiotiques pourraient également protéger contre le cancer du côlon (SANTOSA *et al.*, 2006).

D'autres applications se seraient montrés bénéfiques dans la prévention et le contrôle des infections des voies reproductives (BARRONS et TASSONS, 2008), urinaires (HOESL et ALTWEIN, 2005) et respiratoires (HACINI-RACHINE *et al.*, 2009).

Il existe par ailleurs des souches probiotiques stimulant le système immunitaire; notamment en diminuant de la colonisation des agents pathogènes, en améliorant la synthèse des vitamines, en réduisant l'intolérance au lactose, en réduisant les ballonnements et en améliorant les effets immunomodulateurs (VANDENPLAS *et al.*, 2015).

L'application à long terme de souches probiotiques telles que *L. rhamnosus GG* a réduit le risque de caries dentaires chez les enfants (NÄSE *et al.*, 2001). Cette même souche ainsi que *L.acidofilus* ont également été utilisées pour traiter la vaginose bactérienne (ROSSI *et al.*, 2010).

Certaines souches de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* exercent aussi des effets bactéricides *in vitro* contre *Helicobacter pylori*, et bien que ces effets protecteurs aient été confirmés sur des modèles d'animaux, les résultats des essais cliniques indiquent que les probiotiques n'éradiquent généralement pas *H. pylori*, mais diminuent la densité de colonisation et améliorent la réponse immunitaire (YANG et SHEU, 2012).

Des études poussent à croire que les probiotiques réduiraient potentiellement les risques de dépression (HUANG *et al.*, 2016) et auraient un effet bénéfique dans le traitement du trouble du spectre autistique chez l'enfant. (SHAABAN *et al.*, 2017). Des recherches plus poussées sont cependant nécessaires pour confirmer ce potentiel.

Enfin, ils auraient également des propriétés antimutagènes, d'atténuation des allergies, de réduction du cholestérol sérique, de la pression artérielle ainsi que la réduction du risque du diabète gestationnel (SHOKRYAZDAN *et al.*, 2017).

De plus, l'utilisation des probiotiques en santé humaine a longtemps été considérée comme étant sûr et des effets secondaires n'ont presque jamais été signalés (SHANAHAN, 2012).

I.1.6.2 Applications chez l'animal

En raison de leurs effets bénéfiques sur la santé et le bien-être, les probiotiques sont aujourd'hui largement employés en tant que suppléments aussi bien chez les hommes que chez les animaux (SHOKRYAZDAN *et al.*, 2017) Cependant, la majorité des études sur les probiotiques concernent l'écosystème intestinale ou uro-génital chez l'homme; peu d'études ont abordé ce potentiel chez l'animal (BOUCHARD, 2013).

Les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont majoritairement utilisés pour des applications en nutrition humaine, alors que les genres *Bacillus*, *Enterococcus* et *Saccharomyces* sont les micro-organismes les plus utilisés dans les élevages (SIMON *et al.*, 2001; BERNARDEAU et VERNOUX, 2009).

Au-delà de la nutrition, les probiotiques ont d'autres applications en médecine vétérinaire. Par exemple, les deux souches probiotiques *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* sont considérées prometteuses en terme d'amélioration de l'efficacité des vaccins, comme ce fut le cas pour le vaccin contre l'herpès virus bovin de type 5 (BVH-5: pathogène de la famille des herpès virus qui entraîne une maladie respiratoire et neurologique chez les bovins et les ovins); l'ajout de ces deux souches a permis d'améliorer la réponse immunitaire des bovins vis-à-vis du vaccin. (ROOS *et al.*, 2018).

Nous pouvons également citer l'utilisation des levures *Saccharomyces cerevisiae* comme probiotique pour son efficacité dans la diminution de l'anxiété chez le chien (SIMON, 2019) et celle des deux souches *Lactobacillus helveticus* et *Bifidobacterium longum* sur la réduction de la dépression post-infarctus du myocarde chez le rat (ARSENAULT-BREARD, 2011).

Une nouvelle souche probiotique, *Hafnia alvei* diminue considérablement le gain de poids chez des murins obèses en agissant sur l'activation de la lipolyse (LUCAS *et al.*, 2019).

Dans la perspective de trouver un traitement alternatif aux antibiotiques dans le traitement des mammites chez les bovins (inflammation de la glande mammaire), l'utilisation de souche de *Lactobacillus casei* permet de diminuer la quantité du pathogène *Staphylococcus aureus* internalisé *in vitro* sans nuire aux cellules (BOUCHARD, 2013).

Enfin, l'administration de probiotique *Bacillus cereus var. toyoi* durant le sevrage augmente les performances des truies en termes de reproduction, de viabilité de leurs porcelets et de leur croissance (JIMENEZ et al., 2008).

I.1.7 Les probiotiques en aquaculture:

L'aquaculture est considérée comme la principale source d'approvisionnement en poisson. Elle joue un rôle de plus en plus important au niveau de la satisfaction des besoins alimentaires des populations (NICOLAS et al., 2007). La croissance rapide de cette activité, ainsi que l'intensification mal maîtrisée des systèmes de production, a provoqué le développement de diverses maladies, d'origine virale et bactérienne, qui freine considérablement le développement de ce secteur (CASTEX, 2009).

Les nombreux défis de la production aquacole incluent la lutte contre les épizooties (épidémies touchant les animaux), la mise au point d'aliments appropriés et la gestion de la qualité de l'eau qui sont à l'origine de pertes économiques importantes. Cependant, la lutte contre les pathologies reste une priorité des plus importantes. Les moyens de lutte généralement utilisés contre les maladies d'origine bactérienne sont la vaccination et les antibiotiques (TRAN NGOC TUAN et al., 2013). L'utilisation excessive de ces derniers, a engendré l'apparition de souches bactériennes antibio-résistantes et qui peuvent se transmettre à l'homme (SAPKOTA, 2008 ; NIKAIDO, 2009). De plus, cette utilisation excessive entraîne la persistance des antibiotiques dans les sédiments et l'environnement aquatique en général.

Les produits de substitution qui peuvent réduire l'utilisation d'antibiotiques sont les probiotiques, ces derniers n'ont pas montré des effets néfastes pour l'animal et l'homme mais demandent des autorisations de mise sur le marché (NICOLAS et GATESOUBE, 2007)

I.1.7.1 Évaluation des probiotiques en aquaculture

Comme vu précédemment, un microorganisme doit répondre à plusieurs critères pour qu'il soit reconnu comme étant potentiellement probiotique. Ces critères sont répartis en trois catégories concernant la sécurité, la fonctionnalité et la technologie de production

(KLAENHAMMER et al., 1999 ; SAARELA et al., 2000; OUWEHAND et al., 2002; GUEIMONDE et al., 2006).

D'après (BALCAZAR et al., 2006), en aquaculture, la souche bactérienne doit subir deux types de test d'antagonisme contre les pathogènes.

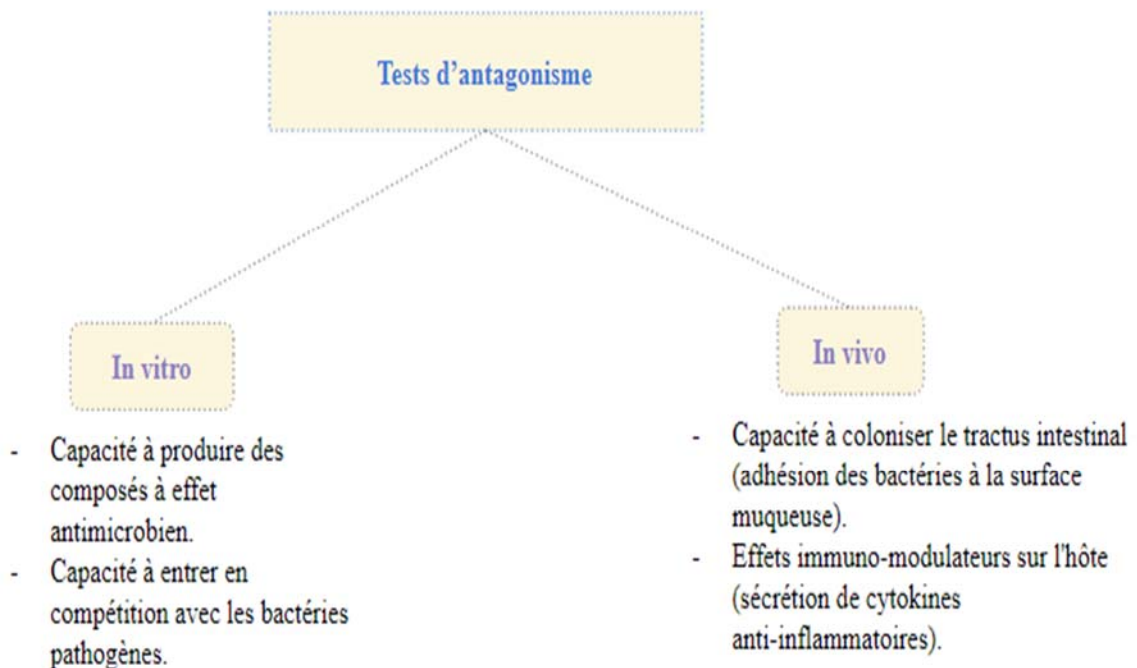


Figure 2: Evaluation in vivo et in vitro de l'effet du potentiel candidat probiotique.

1.1.7.2 Différentes applications des probiotiques en aquaculture:

De nos jours, l'utilisation des probiotiques devient une partie intégrante des pratiques aquacoles visant à optimiser la production. Les espèces les plus fréquemment utilisées en aquaculture comprennent *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Shewanella*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium* et *Saccharomyces* et leur applications concernent surtout l'alimentation et la résistance aux maladies à travers leur activité immunomodulatrice notamment la régulation des gènes liés au système immunitaire (NAYAK, 2010). Ces probiotiques utilisés en aquaculture sont issus des intestins, des branchies, du mucus cutané des animaux aquatiques, des habitats, des collections de cultures ou encore des produits commerciaux.

Un dépistage est cependant nécessaire avant toute utilisation. En effet, une bactérie peut être pathogène pour une espèce aquatique et procurer en même temps des effets bénéfiques à une

autre. La dose ainsi que la durée de prise sont les facteurs primordiaux à considérer pour atteindre le résultat désiré. Les probiotiques sont généralement administrés en tant qu'additif alimentaire et peuvent être des mono-souches, une combinaison de plusieurs ou encore en association avec des immunostimulants prébiotiques (oligo et polysaccharides bénéfique à la santé) sous forme vivante ou morte (HAI, 2015).

Dépendamment du résultat souhaité et de l'application, différentes souches sont utilisées.

I.1.7.3 Utilisation dans l'amélioration de la production aquacole:

Le tableau ci-dessus résume les principaux effets bénéfiques recherchés sur les espèces d'élevage dans l'utilisation de probiotique en aquaculture et les souches utilisées:

Tableau 2: Souches probiotiques utilisées en aquaculture (MARTINEZ CRUZ et al., 2012)

Action recherchée	Probiotique	Espèce aquacole ciblée
Effet bénéfique sur la croissance des poissons	<i>Bacillus sp. S11</i>	<i>Penaeus monodon</i> (RENGPIPAT et al., 1998)
	<i>Bacillus sp</i>	<i>Gadus morhua</i> (QUEIROZ et BOYD, 1998)
	<i>Carnobacterium divergens</i>	<i>Crassostrea gigas</i> (GILDBERG et al., 1997)
	<i>Alteromonas CA2</i>	<i>Crassostrea gigas</i> (DOUILLET et LANGDONE, 1994)
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Scophthalmus maximus</i> (GATESOUBE, 1999)
	<i>Lactobacillus lactis AR21</i>	<i>Brachionus plicatilis</i> (GATESOUBE, 1999)
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Scophthalmus maximus</i> (GATESOUBE, 1999)
	<i>Streptomyces</i>	<i>Xiphophorus helleri</i> (DHARMARA et DHEVENDARAN, 2010)
	<i>L. casei</i>	<i>Poeciliopsis gracilis</i> (HERNANDEZ et al., 2010)

	<i>Bacillus</i> NL 110, <i>Vibrio</i> NE 17	<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (RAHIMAN et al., 2010)
	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Cyprinus carpio koi</i> (LIN SH, 2012)
Inhibition des pathogènes	<i>Bacillus</i> sp	Penaeids (MORIARTY, 1998)
	<i>Enterococcus faecium</i> SF 68	<i>Anguilla anguilla</i> (CHANG et LIU, 2002)
	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (NIKOSKELAINEN et al., 2001)
	<i>Micrococcus luteus</i> A1-6	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (IRANTO et AUSTIN, 2002)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (GRAM et al., 1999)
	<i>P. fluorescens</i> AH2	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (GRAM et al., 2001)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (SPANGGAARD et al., 2001)
	<i>Roseobacter</i> sp. BS. 107	Scallop larvae (RUIZ-PONTE et al., 1999)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. exiguus</i> , <i>Phaffia rhodozyma</i> <i>Carnobacterium</i> sp.	<i>Litopenaeus vannamei</i> (SCHOLZ et al., 1999)
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Salmonids (AUSTIN et al., 1995)
	<i>V. fluvialis</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (IRIANTO et AUSTIN, 2002)
	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Salmo salar</i> (AUSTIN et al., 1992)
	Hg4-03	<i>Hepialus gonggaensis</i> larvae (YOUPING, 2011)
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Clarias gariepinus</i> (ABDULLAH et al., 2011)
	<i>Bacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> sp.	<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> (MOREIRA et al., 2011)

	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Epinephelus coioides</i> (ZHANG et al., 2012)
Amélioration de la digestion des nutriments	<i>L.helveticus</i>	<i>Scophthalmus maximus</i> (GATESOUBE, 1999)
	<i>Bacillus NL 110, Vibrio NE 17</i>	<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (RAHIMAN et al., 2010)
	<i>Carnobacterium sp. Hg4-03</i>	<i>Hepialus gonggaensis larvae</i> (AUSTIN et al., 1995)
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Clarias gariepinus</i> (DOHAIL et al., 2009)
	<i>Shewanella putrefaciens Pdp11</i>	<i>Solea senegalensis</i> (TAPIA et al., 2012)
Amélioration de la tolérance au stress	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i> (CARNEVALI et al., 2006)
	<i>Alteromonas sp.</i>	<i>Sparus auratus</i> (VARELA et al., 2010)
	<i>B. subtilis, L. acidophilus, S. cerevisiae</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i> (TAOKA et al., 2006)
	<i>L. casei</i>	<i>Poecilopsis gracilis</i> (HERNANDEZ et al., 2010)
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Litopenaeus stylirostris</i> (CASTEX et al., 2009)
	<i>Shewanella putrefaciens Pdp11</i>	<i>Makimaki</i> (TAPIA et al., 2012)
Amélioration de la reproduction	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Poecilia reticulata, Xiphophorus maculatus</i> (GHOSH et al., 2007)
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>Danio rerio</i> (GIOACCHINI et al., 2010)
	<i>L. acidophilus, L. casei, Enterococcus faecium, Bifidobacterium thermophilum</i>	<i>Xiphophorus helleri</i> (ABASALI et MOHAMAD, 2010)

I.1.7.4 Utilisation dans le traitement et l'amélioration de la qualité des eaux:

Dans le cas d'un élevage intensif de poisson, l'accumulation des déchets organiques dans les fonds et leur oxydation appauvrit les bassins en oxygène et induit la formation de métabolites toxiques (nitrites, ammoniac..) qui augmentent la mortalité dans ces élevages. Afin d'y remédier, des micro-organismes probiotiques sont introduits dans les bassins et éliminent ces métabolites pour ainsi améliorer la qualité de l'eau (LAMARI, 2014). Ce type de biotechnologie est appelé la biorestauration et les souches utilisées dans ce contexte incluent les *Bacillus*, *Nitrosomonas*, *Cellulomonas*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodoseudomonas*, *Nitrosomonas* et *Acinetobacter* (SHISHEHCHIAN et al, 2001).

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

Objectif du travail

L'étude réalisée a pour but de mettre en évidence les potentielles propriétés probiotiques des souches isolées à partir de l'espèce aquatique prélevée : *Sepia officinalis*. Ces propriétés sont principalement l'activité antibactérienne et la résistance aux conditions du tractus gastro-intestinal (acidité gastrique, sels biliaires, pouvoir d'adhésion cellulaire) pour ainsi sélectionner les souches à potentiel probiotique considérable en vue de diverses applications biotechnologiques particulièrement dans le domaine de l'aquaculture.

II.1 Matériel biologique

L'espèce utilisée dans notre étude fut collectée au mois de Mars 2020. Il s'agit de la seiche commune

Embranchement : Mollusca

Classe : Cephalopoda

Sous-classe : Coleoidea

Super ordre : Decabrachia

Ordre : Sepiida

Famille : Sepiidae

Genre : *Sepia*

Espèce : *Sepia officinalis* (LINNAEUS, 1758)



Figure 3: Représentation de l'espèce *Sepia officinalis*

Sepia officinalis communément appelée la seiche commune est un mollusque vivant jusqu'à 200 mètre de profondeur sur des fonds meubles sables ou graviers en méditerranée, mer baltique et mer du nord. Elle est caractérisée par un corps en forme de fuseau à la coloration marbrée de blanc et de brun sur le dos et blanc au niveau du ventre et se nourrit essentiellement de poissons, de mollusques et de crustacés. Elle possède un œil volumineux avec une pupille en forme de W et sa taille varie de 15 à 45 cm. Comme d'autres céphalopodes, en cas de menace, elle expulse un nuage d'encre noire pour tromper ses ravisseurs. La croissance des jeunes seiches est particulièrement rapide, celles-ci atteignent la maturité sexuelle à partir de l'âge d'un an. Au printemps, les adultes migrent vers les eaux

superficielles ou se déroulent des accouplements et meurent juste après la période de reproduction (NAUSICAA, 2020).

L'analyse du microbiome du tube digestif, des branchies et de la peau chez *S. officinalis*, faite par la combinaison de séquençage d'amplicons d'ARNr 16S, de PCR quantitative et d'imagerie spectrale de fluorescence a révélé un microbiote composé en majeure partie d'espèces de *Vibrionaceae* et *Piscirickettsiaceae* (LUTZ et al, 2019).

II.2 Méthodes

II.2.1 Echantillonnage et isolement des bactéries

Un échantillon de mollusque frais a été prélevé le 12/03/2020 d'une poissonnerie d'Alger. L'échantillon est déposé directement par le vendeur dans un sac en plastique, ce dernier, est mis dans une glacière et dirigé au laboratoire de Microbiologie à l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et d'Aménagement du Littoral.

L'échantillon de *Sepia officinalis* a été manipulé dans des conditions stériles, afin d'effectuer un isolement des bactéries à partir de son tube digestif selon le protocole d'IDOUI et al. Modifié (2009) (Figure4).

L'isolement des souches a été effectué sur deux milieux sélectifs : gélose au Cétrimide et milieu Mac Conkey permettant l'isolement des bactéries à Gram négatif particulièrement *Pseudomonas* et les *Enterobactéries*. A partir des cultures obtenues sur les milieux d'isolement précédents, un repiquage de deux fois a été effectué sur du BHI A (BRAIN HEART INFUSION AGAR) pour obtenir des cultures pures. La conservation des souches a été faite en réalisant un ensemencement par piqure centrale dans des tubes de conservation.

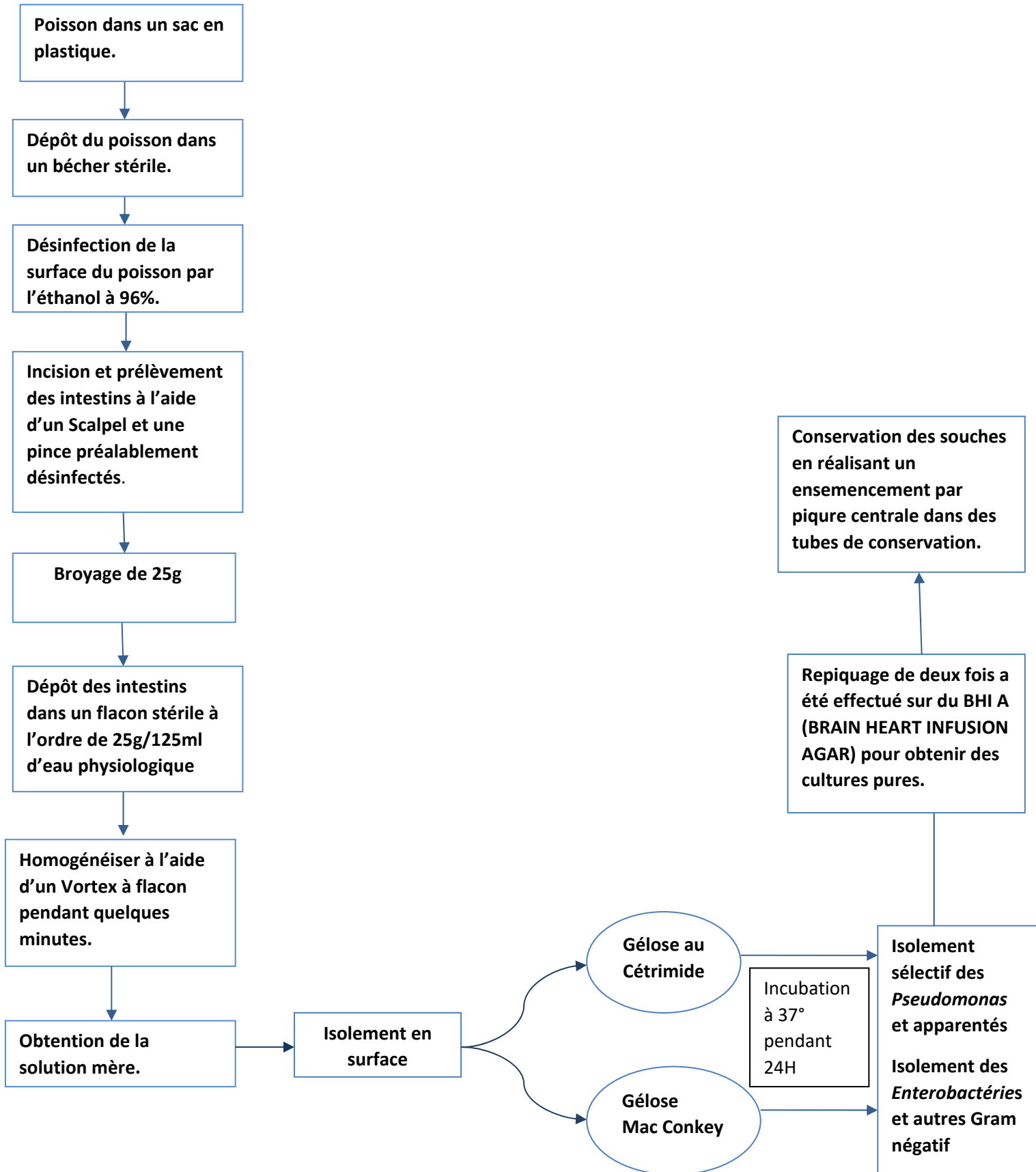


Figure 3: Les différentes étapes d’isolement des bactéries à partir du tube digestif de *S. officinalis*

II.2.2 Identification

II.2.2.1 Caractères morphologiques

II.2.2.1.1 Aspect macroscopique

Le premier critère d'identification est celui de l'aspect macroscopique des colonies isolées vues à l'œil nu; taille, forme du relief (bombée, semi bombée, plate), couleur, aspect (collant, filamenteux...), odeur, transparence (opaque, translucide), allure des contours (régulier, dentelés), pigmentation, et aspect de la surface (lisse ou rugueuse).

II.2.2.1.2 Aspect microscopique (coloration de gram)

Cette technique a pour but de déterminer l'aspect microscopique de la bactérie (morphologie : cocci, bacille.. et agencement) ainsi que la nature de sa paroi (Gram+, Gram-).

Préparation d'un frottis

À l'aide d'une anse de platine, une colonie bactérienne jeune a été prélevée et déposée sur une lame propre contenant une goutte d'eau stérile. Elle a ensuite été étalée, séchée puis fixée à la chaleur du bec bunsen.

Coloration de Gram

- Quelques gouttes de violet de Gentiane ont été déposées sur le frottis fixé pendant une minute, après rinçage, on ajoute le Lugol pendant 30 secondes.
- Le violet de gentiane va permettre de colorer le cytoplasme des bactéries, quant au Lugol (composé iodé) joue le rôle d'un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries.
- La décoloration se fait en coulant la solution d'alcool sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis, entre 5 à 10 secondes. L'alcool ne va traverser que la paroi de certaines bactéries (Gram-) et décolorer leur cytoplasme.
- La dernière étape consiste à verser quelques gouttes de Fushine sur la lame en laissant agir une minute. Le colorant permet de visualiser les bactéries décolorées (Gram négatif).
- Après chaque étape, la lame est rincée avec de l'eau distillée.
- Après séchage, on passe à l'observation microscopique (grossissement 40X puis 100X) où les cellules Gram positif apparaissent en violet et les cellules Gram négatif apparaissent en rose (**BARTHOLOMEW et MITTWER , 1952**).

II.2.2.2 Caractère enzymatique (Test d'oxydase)

La recherche d'oxydase est un test fondamental pour orienter l'identification des bactéries à Gram négatif. Le réactif PDA (N-diméthyl paraphénylène diamine) est souvent imprégné sur des disques (disques oxydases).

A partir d'un milieu solide, à l'aide d'une pipette Pasteur, une colonie est déposée sur un disque oxydase placé sur une lame. Dans le cas de l'apparition d'une coloration violette, la bactérie est considérée oxydase+ (possède le cytochrome oxydase) (LEYRAL et JOFFIN, 2005).

II.2.2.3 Identification biochimique par la galerie API 20 E (BioMérieux, France)

Principe

Le système API 20E BioMérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques pour l'identification de bacilles à Gram négatif dont les Entérobactéries (MURRAY et al., 1999).

La galerie comporte 20 alvéoles contenant des substrats sous forme déshydratée. Les différents tests sont inoculés avec une suspension bactérienne de densité convenable. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par addition de réactifs.

L'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (MOUSTARDIER, 1972)



Figure 4: Galerie API 20E

Mode opératoire

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les microtubes afin de créer une atmosphère humide, puis, déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- A l'aide d'une pipette la suspension bactérienne est introduite dans les tubes et cupules des tests: CIT, VP, GEL Pour les autres tests, seuls les tubes sont remplis
- Les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, nécessitent une anaérobiose en remplissant leur cupule avec l'huile de vaseline.
- Après avoir préparé la galerie API20E, fermer la boîte d'incubation et incuber à 37± 2°C (MURRAY et al., 1999).

Lecture

- Noter sur la fiche les résultats de toutes les réactions spontanées.
- Révéler les tests nécessitant l'ajout de réactifs:
- Test VP: l'ajout d'une goutte de réactif VP1 et VP2. Une couleur rose franche apparaît dans les 10 minutes, indique une réaction positive
- Test TDA: l'ajout d'une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncé indique une réaction positive.
- Test IND: l'ajout d'une goutte de réactif Kovacs, l'apparition instantanée d'un anneau rouge indique une réaction positive.
- La lecture des réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20E (CASTILLO et BRÜCKNER, 1984).

II.2.3 Le test du pouvoir antagoniste par la méthode des puits

La méthode des puits repose sur la diffusion d'agents inhibiteurs dans des puits creusés dans une gélose contenant dans sa masse une souche indicatrice. Le milieu utilisé consiste en une gélose Mueller Hinton (MH) coulée en boîte de Pétri. L'ensemencement se fait en trempant un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne puis on le frotte sur la totalité de la surface gélosée en stries serrées. Cette opération est répétée trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. Les souches indicatrices utilisées sont : *E.coli* ECTC8, *E.coli* K12, *Vibrio fluvialis*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* ; ces souches sont considérées comme pathogènes chez les poissons d'intérêts aquacoles.

Des puits de 4 mm de diamètre ont été réalisés à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, ensuite, chaque puit a été rempli par 100 μ l de suspension bactérienne des souches inhibitrices (**figure 6**). Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h. L'inhibition est révélée par la présence de zones d'inhibition (halo) autour des puits (**BAREFOOT & KLAENHAMMER, 1983**).

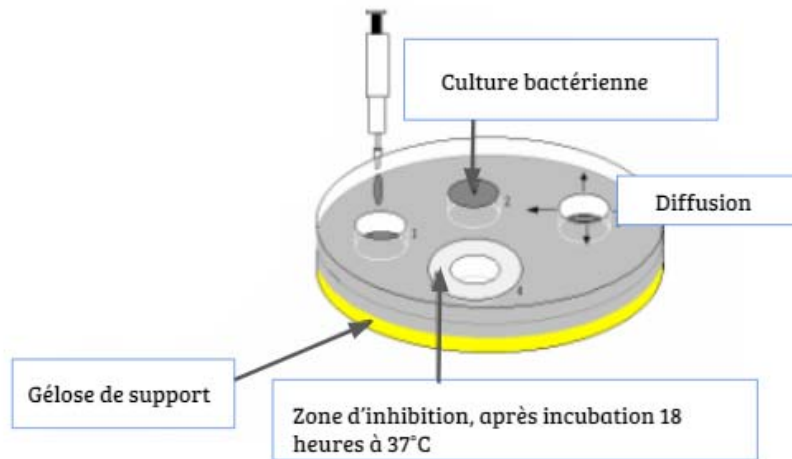


Figure 5: Schéma représentant la méthode de détection de l'antagonisme bactérien par puits (adaptée d'après **BAREFOOT et KLAENHAMMER, 1983**).

II.2.4 Test de production de biofilm

Une culture bactérienne jeune de 18h est ajustée à une densité optique comprise entre 0.56 – 0.64 à une longueur d'onde de 540 nm. Un volume de 250 μ l de chaque suspension est incubé sur les plaques de 96 puits stériles pendant 6h à 37°C. Après incubation, chaque puit est d'abord lavé avec 25 μ l de cristal violet à 1% qu'on laisse reposer pendant 15 minutes. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec 200 μ l de PBS stérile, puis deux fois avec 200 μ l d'éthyle alcool. Le contenu de l'inoculum est introduit dans un tube à essai contenant un volume de 1.2 ml d'alcool. Après agitation, la DO est mesurée à une longueur d'onde de 540 nm. Les souches bactériennes sont qualifiées de fortes productrices de biofilm si la DO est supérieure à 0,500, de productrices moyenne si la DO est comprise entre 0.500 et 0.100 et de faibles productrices si la DO est inférieure à 0.100 (**MALDONADO et al., 2007**). L'expérience a été faite en triplicata.

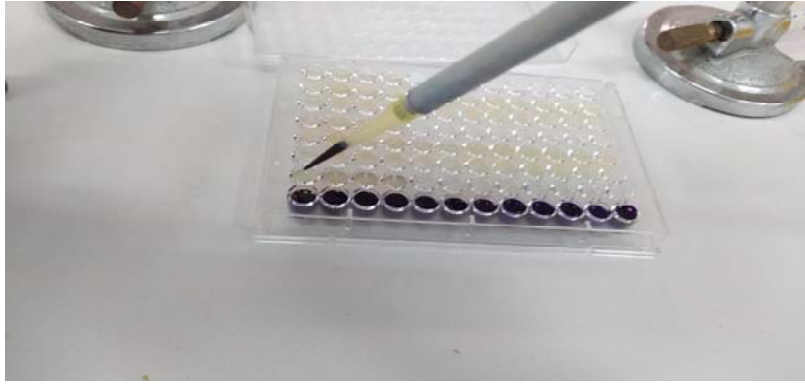


Figure 6: Photo représentative de la méthode suivie lors du test de production de biofilm

II.2.5 Test d'antibio-résistance

Les souches isolées ont été testées vis-à-vis de 13 disques d'antibiotiques (Tableau3) :

Tableau 3: Liste des antibiotiques utilisés dans le test d'antibio-résistance

Boite	Nom de l'antibiotique	Symbole	Charge
1	Amoxicilline	AX	25µg
	Tétracycline	TE	30µg
	Aztréonam	ATM	30µg
	Cefoxitine	FOX	30µg
	Ceftazidime	CAZ	30µg
	Oxacilline	OX	5µg
2	Gentamicine	CN	10µg
	Amikacine	AK	30µg
	Triméthoprim + sulfaméthoxazole	SXT	25µg
	Ciprofloxacine	CIP	5µg
	Acide nalidixique	NA	30µg
	Triméthoprim	TMP	5µg
	Clindamycine	CD	2µg

A partir d'une culture jeune de 18-24h, des colonies ont été prélevées et déposées dans 5ml d'eau physiologique stérile à raison d'une concentration de 10^8 (ajuster à une DO incluse entre 0.08 et 0.1 à une longueur d'onde de 625nm). On procède ensuite à l'écouvillonnage par stries serrées de chaque souche sur 2 boîtes de pétri contenant de la gélose MH à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne puis essoré. Les disques d'antibiotiques sont ensuite déposés à 3cm d'écart les uns des autres sur les boîtes préalablement ensemencées. Les boîtes sont incubées à 37° pendant 24h.

Les diamètres des zones d'inhibition de croissance autour de chaque disque ont été mesurés. Les résultats sont interprétés selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie CA-SFM (2017). Les résultats sont exprimés par (S) sensible, (I) intermédiaire et (R) résistant.

II.2.6 Test d'hémolyse

A partir d'une culture jeune, un ensemencement en stries a été effectué sur des boîtes de gélose Columbia contenant 5% de sang frais (humain) puis incubées pendant 24 h à 37°C. Après incubation, on distingue l' α -hémolyse: halo transparent autour des colonies (hémolyse totale), la β -hémolyse: halo verdâtre autour des colonies (hémolyse partielle) ou la γ hémolyse qui représente l'absence d'hémolyse (MARAGKOUidakis et al., 2006).

II.2.7 Test de la résistance au pH gastrique

Après revivification des souches test, 1 ml a été suspendu dans une solution de BHI bouillon ajustée à pH 2, pH 3, pH 4 et pH 7 et incubée à 37°C (EI-JENI et al., 2015). Après 3h d'incubation, le taux de survie des bactéries dans les différents pH est estimé par un dénombrement en surface fait à partir de plusieurs dilutions, accompagné par une mesure comparative de la densité optique (à t=0 et t=3h) (MUTHUKUMAR et KANDEEPAN, 2015). L'expérience a été faite en triplicata.

II.2.8 Test de la résistance aux sels biliars

Après une revivification des souches test, 1 ml a été suspendu dans une solution de BHI bouillon ajustée à pH 7 avec une concentration d'Oxgall de 0.3% et incubée à 37°C. (EI-JENI et al. 2015). Après 3h d'incubation, le taux de survie des bactéries dans le bouillon de BHI contenant les sels biliars est estimé par un dénombrement en surface fait à partir de plusieurs dilutions accompagné d'une mesure comparative de la densité optique. (A t=0 et t=3h) (MUTHUKUMAR et KANDEEPAN, 2015). L'expérience a été faite en triplicata.

**CHAPITRE III: RESULTATS ET
DISCUSSION**

L'objectif de ce travail a été d'isoler des bactéries à potentiel probiotique à partir de *Sepia officinalis* en vue d'une application dans le domaine d'aquaculture.

Dans la pratique, on s'est basée d'abord sur les tests d'antagonisme, la production de biofilm et d'antibio-résistance afin de sélectionner des souches intéressantes suivi des tests de la résistance au pH et aux sels biliaries et de l'activité hémolytique.

III.1 Isolement et identification:

A partir de notre échantillon, 13 souches ont été isolées sur les milieux Cétrimide (n=9) et Mac conkey (n=4).

La gélose au cétrimide est un milieu sélectif qui permet la sélection du genre *Pseudomonas* et apparenté. Les colonies bactériennes observées ont été de grande taille avec un aspect bombé au centre, présentant un reflet métallique et un contour irrégulier. De plus, certaines souches ont présenté une pigmentation verte diffusant dans toute la boîte de Pétri augurant de la présence de l'espèce *P. aeruginosa*.

La gélose Mac Conkey est un milieu qui permet la sélection des entérobactéries particulièrement les coliformes (lactose +) qui apparaissent sous forme de colonies roses, de taille moyenne, lisses et de forme ronde ou les bactéries lactose négatif qui apparaissent transparentes. Parmi nos 4 souches isolées sur Mac Conkey, 3 ont été de couleur transparentes, de taille moyenne, lisses et de forme ronde; seulement une souche est apparue de couleur rose, de taille moyenne, lisses et de forme ronde.

L'observation microscopique des bactéries après coloration de Gram a montré que ces bactéries sont sous forme de bacilles à Gram négatif (**Figure 8**).

La confirmation de l'identification des souches s'est basée sur la réalisation des tests biochimiques complémentaires : test oxydase et galerie API20E.

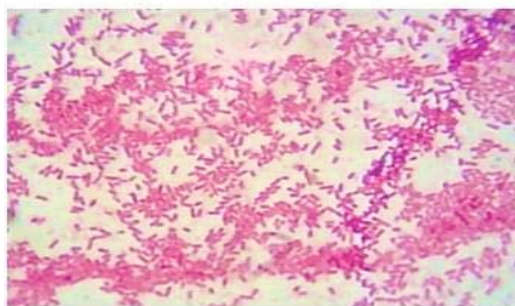


Figure 7: Illustration d'une observation microscopique d'une souche à Gram négatif (Pseudo2) après coloration de Gram (Gx 100X)

La confirmation de l'identification des souches s'est faite par des tests biochimiques complémentaires : test oxydase et galerie API20E.

- **Caractère enzymatique (Test d'oxydase)**

Les tests d'oxydase effectués ont donné des résultats positifs. La zone réactionnelle sur le disque d'oxydase est colorée en violet, ce qui suggère la présence du cytochrome oxydase (Figure 9) qui intervient dans la chaîne respiratoire de certaines bactéries exemple *Pseudomonas*. Le cytochrome oxydase oxyde le cytochrome C qui va, à son tour, oxyder le tétraméthyl-1,4-phénylène diamine, substrat qui prend une coloration violet foncée (DHAYNITHI et al., 2010). Ce test permet de confirmer la présence du genre *Pseudomonas* sur le milieu gélose au cétrimide.



Figure 8: Résultat positif de l'oxydase chez l'une des souches testées.

- **Caractères biochimiques (Galerie API 20 E):**

La confirmation de l'identification des espèces bactériennes retrouvées a été réalisée par la galerie API 20E. Les résultats obtenus ont permis d'assigner nos souches aux espèces *Pseudomonas aeruginosa*; *Pseudomonas fluorescens* et *Aeromonas hydrophila*. (Tableau 4)

Tableau 4: Les résultats des différents tests de la Galerie biochimique API 20E.

Tests	Résultats		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
ONPG(orthonitrophényl-betaDgalactopyranoside)	-	-	+
ADH (arginine dihydrolase)	+	+	-
LDC (lysine décarboxylase)	-	-	-
ODC (ornithine décarboxylase)	+	-	-
CIT (Assimilation de nitrate)	+	+	-
H2S (production d'hydrogène sulfuré)	-	-	-
URE (uréase)	-	-	-
TDA (Tryptophane désaminase)	-	-	-
IND (Production indole)	-	-	+
VP (production d'acétoïne)	-	+	+
GEL (synthèse d'une gélatinase)	+	+	+
GLU (Glucose)	+	-	+
MAN (Mannitol)	-	+	+
INO (Inositol)	-	+	-
SOR	-	-	-
RHA (Rhamnose)	-	-	+
SAC (Saccharose)	-	-	+
MEL (Mélibiose)	+	-	+
AMY(Amygdaline)	-	-	-
ARA (Arabinose)	+	+	-
Oxydase	+	+	+



Figure 9: Illustration du profil biochimique de la souche *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau 5: Résultat de l'identification des souches isolées

Souche	Milieu de sélection	Aspect microscopique	Aspect macroscopique	Production de pigment	Coloration de Gram	Test oxydase	Identification *	
MKB4	Mac conkey	Bacilles, fins et droits très mobile, diplobacilles.	Colonies de taille moyenne, transparentes, lisse et ronde	Vert	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
MKB3 transparente				Vert	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
MK7				Vert	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa*</i>	
MKB3 opaque		Bacilles droits à extrémité arrondies, mobile.	Colonies de taille moyenne, roses, lisse et ronde	Absent	-	+	<i>Aeromonas Hydrophila*</i>	
BHIA2	Gélose Cétrimide	Bacilles, fins et droits très mobile, diplobacilles.		Absent	-	+	<i>Pseudomonas fluorescens*</i>	
BHIA3				Vert	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
BHIA4				Vert	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
BHIA6				Absent	-	+	<i>Non-fermenter*</i>	
BHIA8				Absent	-	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
BHIA9					Vert	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C1					Vert	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pseudo1					Vert	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa*</i>
Pseudo2					Vert	-	+	<i>Pseudomonas aeruginosa *</i>

*souche identifiée par galerie API20E

III.2 Test d'antagonisme

L'activité antimicrobienne est l'un des critères les plus importants pour la sélection des souches probiotiques. Le test des puits a été réalisé pour les 13 souches isolées dans le but de déterminer les souches dotées d'un pouvoir antagonisme important.

Le tableau (6) représente les résultats obtenus vis à vis de 5 souches indicatrices. Les diamètres des zones d'inhibition sont représentés en mm.

Tableau 6: Résultat du test d'antagonisme

Code de la souche	Identification	Origine	Pouvoir antagoniste vis à vis des souches indicatrice (Zone d'inhibition en mm)				
			A	B	C	D	E
BHIA2	<i>Pseudomonas fluroescens</i>	Sepia officinalis	29	0	0	0	27
BHIA6	<i>Non-fermenter</i>		20	0	21	0	0
Pseudo1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		26	11	40	0	11
Pseudo2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		31	19	40	0	14
BHIA8	<i>Pseudomonas fluroescens</i>		0	0	10	0	0
MK7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		22	15	24	0	17
C1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		28	0	15	0	14
BHIA3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		22	0	15	0	14
MKB3 O	<i>Aeromonas hydrophila</i>		0	0	10	0	0
MKB4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		11	21	10	0	0
BHIA4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		11	31	22	0	0
BHIA9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		19	29	20	0	0
MKB3T	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		22	29	0	0	0
Témoin		0	0	0	0	0	

Légende tableau: A : *E. Coli ECTC8* (souche BLSE positif), B: *E coli K12*, C: *Vibrio fluvialis*

D:*Pseudomonas aeruginosa* E : *Aeromonas hydrophila*, 0 : Résultats négatifs (Absence de zone d'inhibition)

Après incubation, les 13 souches ont montré une activité inhibitrice variable vis à vis des souches indicatrices (*E.coli ECTC8*, *E.coli K12*, *Vibrio fluvialis*, et *Aeromonas hydrophila*) avec des diamètres d'inhibition qui varient entre: 10 mm et 40 mm.

Parmi les souches isolées sur milieu Mac Conkey, la souche *Aeromonas hydrophila* (MKB3 opaque) a présenté une activité contre uniquement la souche de *V. fluvialis*, alors que la souche *Pseudomonas aeruginosa* (MKB3T) a présenté une activité antibactérienne contre les deux souches d'*E.coli* (la naturelle et la multirésistante). *Pseudomonas aeruginosa* MKB4, MK7 ont présenté une activité antibactérienne contre minimum 3 souches indicatrices testées. Les souches isolées sur gélose au cétrimide ont présenté une activité antibactérienne contre la souche *V. fluvialis* seulement (*Pseudomonas fluorescens* BHIA8); contre 2 à 3 souches indicatrices pour les autres souches à l'exception des souches *Pseudomonas aeruginosa* Pseudo1, Pseudo2 qui ont présenté une activité antibactérienne contre les 4 souches indicatrices avec des diamètres d'inhibition relativement plus important allant de 10 mm à 40 mm.

Les bactéries marines sont connues pour avoir un grand pouvoir antagoniste en produisant une grande variété de métabolites secondaires structurellement diversifiés et biologiquement actifs. Par exemple, plus de 60% des bactéries provenant du zooplancton produisent des substances bactériolytiques (NAIR *et al.*, 1986).

En observant le tableau des résultats de l'antagonisme, on remarque que la souche Pseudo 1 (*Pseudomonas aeruginosa*) a présenté une activité antimicrobienne vis à vis de *Vibrio fluvialis*, *Aeromonas hydrophila*, *E coli EcTC8* et *E coli k12* avec un diamètre d'inhibition 26 mm, 11 mm, 40 mm contre *E coli*, *Aeromonas* et *Vibrio* respectivement. La souche Pseudo2 (*Pseudomonas aeruginosa*) a également présenté une activité antimicrobienne contre vis à vis de *Vibrio fluvialis*, *Aeromonas hydrophila*, *E coli EcTC8* et *E coli k12* avec un diamètre d'inhibition 31 mm, 14 mm, 40 mm contre *E coli*, *Aeromonas* et *Vibrio* respectivement. Ces résultats corroborent ceux rapportés dans les travaux de VEERENDRAKUMAR *et al.*, (2015), qui ont rapporté que les souches de *Pseudomonas* d'origine marine présentent une activité antimicrobienne contre les souches *Aeromonas hydrophila* et *E.coli* avec des diamètres d'inhibition de 12 et 20 mm, respectivement.

Une autre étude menée par GRAM *et al.*, (1998) a montré l'effet antagoniste de *Pseudomonas fluorescens* contre *Vibrio spp* avec un diamètre d'inhibition allant de 3 à 11 mm.

Les bactéries à Gram négatif du genre *Pseudomonas* produisent une gamme importante de métabolites secondaires, en plus d'enzymes dégradant les parois cellulaires. Les plus caractérisés de ces métabolites secondaires sont les: phénazines, phloroglucinols,

pyolutéorine, pyrrolnitrine, lipopeptides, et le cyanure d'hydrogène. Ces métabolites secondaires sont actifs vis à vis d'une large gamme de bactéries et de champignons (EISSA et al., 2014).

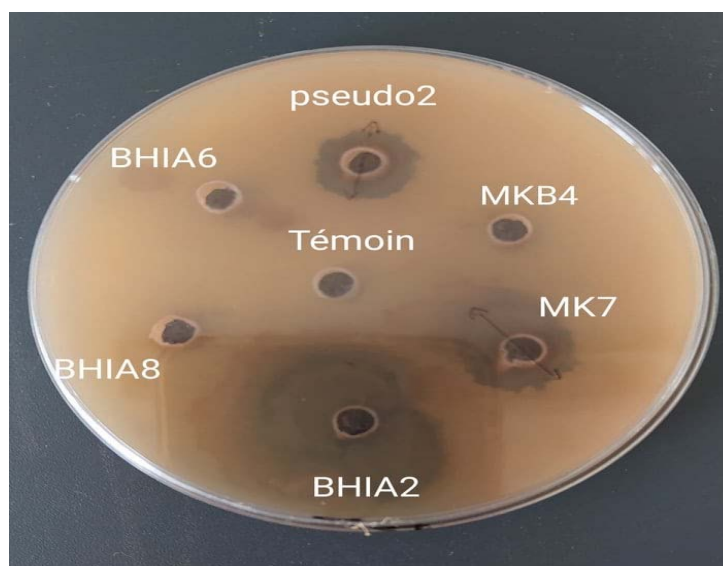


Figure 10: Illustration des résultats du test d'antagonisme sur les souches testées.

III.3 Test de production de biofilm

Un biofilm peut être défini comme un assemblage de micro-organismes comprenant des espèces microbiennes attachées à une surface biologique ou inerte et enfermées dans une matrice auto-synthétisée comprenant de l'eau, des protéines, des glucides et de l'ADN extracellulaire (COSTERTON et al., 1987).

L'adhésion aux surfaces, en particulier au mucus intestinal, est un paramètre important permettant aux bactéries probiotiques de coloniser le tractus gastro-intestinal. Cette adhésion permet de bloquer l'accès aux pathogènes et exerce un effet barrière (MAHDHI et al. 2011).

La majorité de nos souches sont de moyennes productrices de biofilm avec une densité optique comprise entre 0.1 et 0.5 (figure 12). La souche *Non fermenter sp* « BHIA6 » est considérée faible productrice avec une densité optique inférieure à 0.1. Seule la souche *P. aeruginosa* « Pseudo2 » est dite forte productrice de biofilm avec une densité optique

supérieure à 0.5 et présente alors potentiellement une adhésion importante aux surfaces.

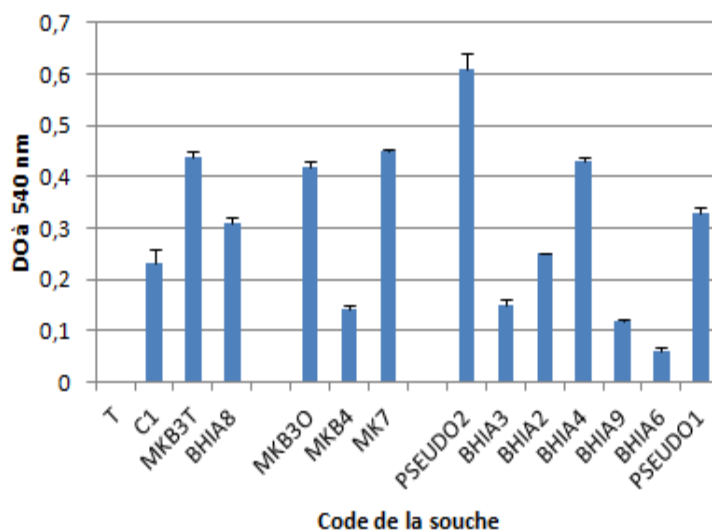


Figure 11: Résultats du test de production de biofilm pour les souches isolées.

D'après l'étude menée par **KORKEA-AHO et al., (2011)**, des souches du genre *Pseudomonas* ont été introduites dans l'alimentation des truites arc-en-ciel d'élevage pour prévenir de la flavobactériose et ce en observant leur capacité à s'attacher aux cellules épithéliales des intestins des poissons. Les résultats obtenus ont montré une valeur élevée de bactéries du genre *Pseudomonas* dans l'intestin des poissons nourris (1.9×10^4 UFC g^{-1}) et négligeable dans le groupe non supplémenté (15.2 UFC. g^{-1}).

De nombreuses bactéries ont fait l'objet d'études quant à leur capacité à former des biofilms. On peut citer par exemple, des bactéries à Gram négatif comme *Vibrio Cholerae*, *Escherichia coli* ou *P. aeruginosa*. Les rassemblements de bactéries du genre conduisent à la formation de micro-colonies dont la différenciation mène à l'élaboration du biofilm. La matrice d'exopolysaccharide, essentiellement l'alginate pour *Pseudomonas aeruginosa*, représente quelque 85 % du volume total. Cette matrice renforce la structure du biofilm tout en lui conservant une grande plasticité. (**COSTERTON et al.,1999**)

L'adhésion et la survie des bactéries probiotiques dans le tractus gastro intestinal est considérée comme bénéfique pour la réplication et même la colonisation par la bactérie, qui à son tour est considérée comme bénéfique pour l'hôte (**GISMONDO et al., 1999**)

D'autre part, la capacité des micro-organismes à former des biofilms permet leur utilisation dans la dégradation de divers polluants environnementaux; ce qui représente un processus de bioremédiation rentable et écologique (MITRA et MUKHOPADHYAY, 2016).

Une étude faite sur les biofilms des espèces *P.aeruginosa* et *P.fluorescens* a d'ailleurs démontré leur efficacité en termes de bioremédiation en dégradant l'essence (mélange d'hydrocarbures), le xylène et le benzène (composés monoaromatiques) et le cyclohexane (composé cyclique). (MELIANI et BENSOLTANE, 2014) L'implication des biofilms des *Pseudomonas* dans la bioremediation des hydrocarbures confirme l'intérêt de nos résultats dans lesquels les souches *Pseudomonas* présentent une importante production de biofilm particulièrement la souche Pseudo2.

III.4 Antibiogramme

Nous avons testé la sensibilité des 13 souches vis à vis de 13 antibiotiques de différentes familles. (Tableau 7)

Tableau 7: Résultat de l'antibiogramme

Souche	Identification	Antibiotiques												
		AX	TE	ATM	FOX	CAZ	OX	SXT	AK	CN	TMP	NA	CIP	CD
MK7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R
Pseudo 1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R
Pseudo 2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R
BHIA 2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	I	I	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
BHIA 3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R
BHIA 9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	I	S	R	R	R	I	S	R	R	R	S	R
BHIA 4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R
MKB3 opaque	<i>Aeromonas hydrophila</i>	S	S	R	S	R	S	R	S	I	R	R	I	S
MKB3 transparente	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	R	S	R	R	I	I	R	R	I	S	R
BHIA 8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R	S	R	S	R	R	R	I	S	R	S	S	R
C1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R	S	S	I	R	S	S	I	S	R
MKB 4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R

Tous les produits bactériens destinés à être utilisés comme additifs dans l'alimentation animale notamment en aquaculture, doivent être examinés afin de déterminer la sensibilité des souches à la gamme appropriée d'antibiotiques (VANKERCKHOVEN *et al.* 2008).

Les résultats montrent qu'une partie de nos souches étaient sensibles à: l'aztreoname (à l'exception des souches BHIA2 *Pseudomonas fluorescens* et BHIA6 *Non-fermenter sp* qui sont intermédiaires); l'amikacine (à l'exception des souches BHIA8 *Pseudomonas fluorescens* et MKB3 transparente *Pseudomonas aeruginosa* qui sont intermédiaires) et à la ciprofloxacine (à l'exception de la souche MKB3 opaque *Aeromonas hydrophila* qui est intermédiaire).

En ce qui concerne les 3 souches *Pseudomonas aeruginosa* (MK7, Pseudo1, Pseudo2) considérées comme potentiellement intéressantes dû à leur forte activité antimicrobienne et d'une production importante de biofilm, elles sont sensibles à l'amikacine, à la gentamicine et

à la ciprofloxacine. Elles montrent cependant une résistance à l'amoxicilline, à la tétracycline, à l'aztreonam, à l'oxacilline, au triméthoprim + sulfaméthoxazol, au triméthoprim, à l'acide nalidixique ainsi qu'à la clindamycine. Deux d'entre elles (66%) sont résistantes à la céfoxitine et à la ceftazidime. D'après **IGBINOSA et al., (2017)** Le test de sensibilité aux antibiotiques a été réalisé pour des souches du genre *Pseudomonas* isolées à partir d'échantillons aquatiques, les isolats ont présentés une résistance à 75% contre ceftazidime et tétracycline, 66.67% sont résistants à la gentamicin, 16.67% résistants au ciprofloxacine, 79.17% résistants à l'aztreonam. Nous pouvons dire que nos résultats concordent avec les résultats des études obtenus confirment la résistance des *Pseudomonas* aux antibiotiques utilisés.

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont naturellement résistantes à de nombreux antibiotiques car elles sécrètent une céphalosporinase qui provoque l'inactivation des B-lactamines. Cette bactérie présente de très nombreux mécanismes de résistance comme l'imperméabilité par déficits en porines ou par mutation du LPS, et surtout par des mécanismes de pompes à efflux actif ce qui justifie sa multirésistance, en plus des mécanismes enzymatiques comme la synthèse des β -lactamases chromosomiques pour les β -lactamines (**MAURIN et al.,1995**) ou la production d'enzymes modificatrices conférants résistance aux aminosides (gentamicine, kanamycine et streptomycine) (**LAMBERT et al.,2006**)

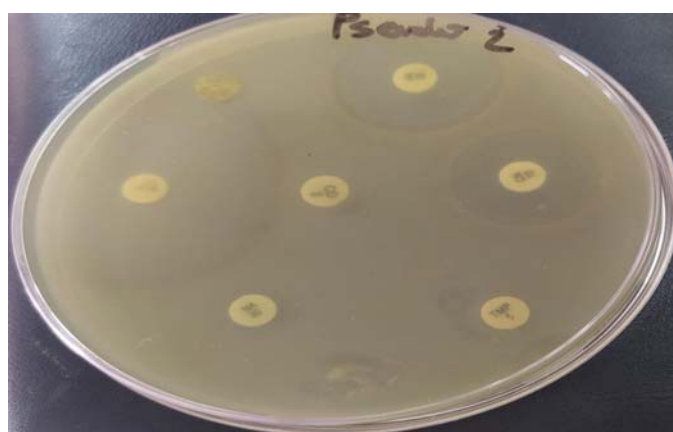


Figure 12: Illustration des résultats du test d'antibiorésistance de la souche *P. aeruginosa* (Pseudo 2)

En se basant sur les résultats du test d'antagonisme, de la production de biofilm et de l'antibio-résistance; 3 souches du genre *Pseudomonas* sont jugées intéressantes et ont été

sélectionnées pour la suite des tests: test d'hémolyse et test de résistance au pH et aux sels biliaires. Il s'agit des souches Pseudo1, Pseudo2 et MK7 (*Pseudomonas aeruginosa*) qui sont caractérisées par leur forte production de biofilm et un pouvoir antagoniste important.

III.5 Test d'hémolyse

L'absence d'activité hémolytique est à son tour une condition préalable nécessaire à la sélection d'une souche probiotique. Les 3 souches testées ont donné les résultats représentés dans le (Tableau 8)

Tableau 8 : Résultats du test d'hémolyse.

Code	Identification	Hémolyse
Pseudo 1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	γ-hémolyse (absence d'hémolyse)
Pseudo 2		α-hémolyse (partielle, halo verdâtre)
MK7		α-hémolyse (partielle, halo verdâtre)

Dans la littérature, l'activité hémolytique des souches *Pseudomonas* présente un caractère variable. Cette variabilité s'explique par l'émergence de variants phénotypiques de la souche, qui présentent des propriétés de virulence différentes. (ROSSIGNOL, 2007) Une souche de *P. aeruginosa* présente une activité létale chez la souris et une cytotoxicité importante vis-à-vis des leucocytes et différents types cellulaires (HAYASHI et al., 1989; LUTZ et al., 1993, ROSSIGNOL, 2007), mais ne présente pas d'activité hémolytique vis-à-vis des érythrocytes humains (SLIWINSKI-KORELL et al., 1999, ROSSIGNOL, 2007). Dans notre étude, les 3 souches du genre *Pseudomonas* ont prouvé leur innocuité: la souche *Pseudomonas aeruginosa* Pseudo 1 ne présente aucune activité hémolytique tandis que les deux autres souches *Pseudomonas aeruginosa* Pseudo 2 et MK7 sont caractérisées par une hémolyse partielle. L'absence d'hémolyse totale d'espèce issue du tube digestive d'une espèce aquatique a déjà été démontré par RAMESH et al., (2015) sur des souches provenant du poisson *Labeorohita*.

III.6 Test de résistance au pH gastrique et aux sels biliaires

Dans le cas d'une application sur un être vivant, la souche probiotique administrée par voie orale se doit de survivre à l'acidité du suc gastrique dans l'estomac et aux sels biliaires dans l'intestin grêle.

III.6.1 Résistance au pH

La résistance au pH a été évaluée après 3h d'incubation des souches à différents pH: 2, 3, 4 et 7. Cette résistance a été mesurée par comparaison de la densité optique suivie d'un dénombrement en surface pour chaque souche (figure 14 et 15)

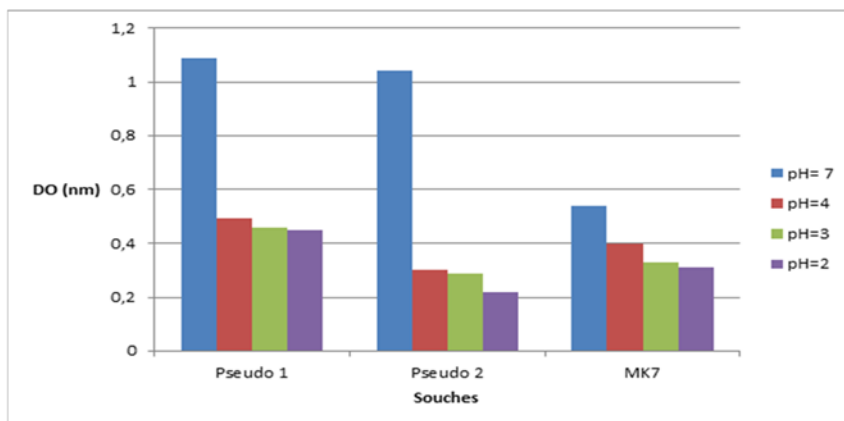


Figure 13: Résultats de l'effet du pH après 3h d'incubation par mesure de la densité optique.

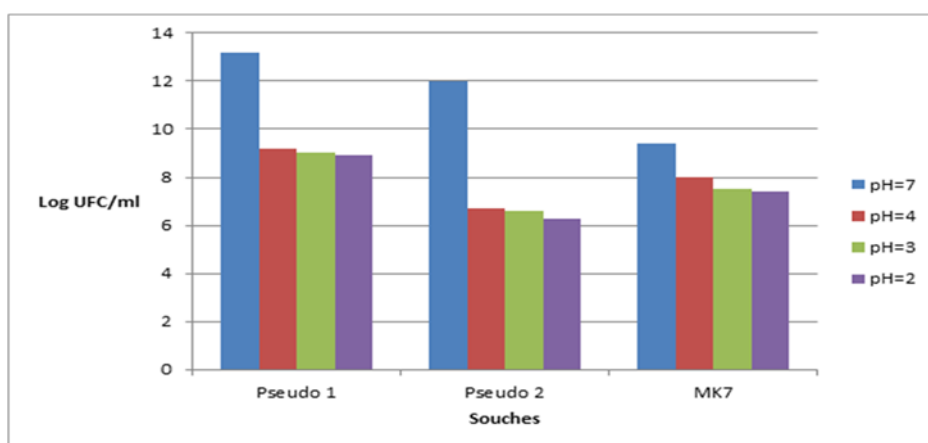


Figure 14: Résultats de l'effet du pH après 3h d'incubation par dénombrement.

Le pH naturel d'un estomac vide étant de 1.5, après un repas, il augmente jusqu'à 5-6 pour ainsi empêcher la prolifération de bactéries pathogènes, c'est pourquoi il est important pour l'utilisation d'un probiotique que celui-ci puisse résister en nombre suffisant à des variations de pH allant de 1 à 7 (HUANG et ADAMS, 2004). Dans notre étude, les résultats obtenus montrent que les 3 souches résistent aux pH 2, 3, 4 et 7 en concentration décroissante et avec de légères variations dépendamment des souches, ce qui suggère qu'elles pourraient résister à des milieux acides comme l'estomac. La souche *P. aeruginosa* Pseudo 2 reste cependant relativement plus sensible à l'acidité par rapport aux deux autres souches *P. aeruginosa* Pseudo1 et MK7.

III.6.2 Résistance aux sels biliaires

La résistance aux sels biliaires a été évaluée après 3h d'incubation des souches en présence de 0.3% d'oxgall. La concentration maximale présente dans le tractus gastro-intestinal est estimée à 0.5% (QUZEHAUD et VESTERLUND, 2004). Les résultats représentés dans les figures (16 et 17) comparent l'évolution de la densité optique et la charge microbienne en présence et en absence des sels biliaire pour chacune des souches testées.

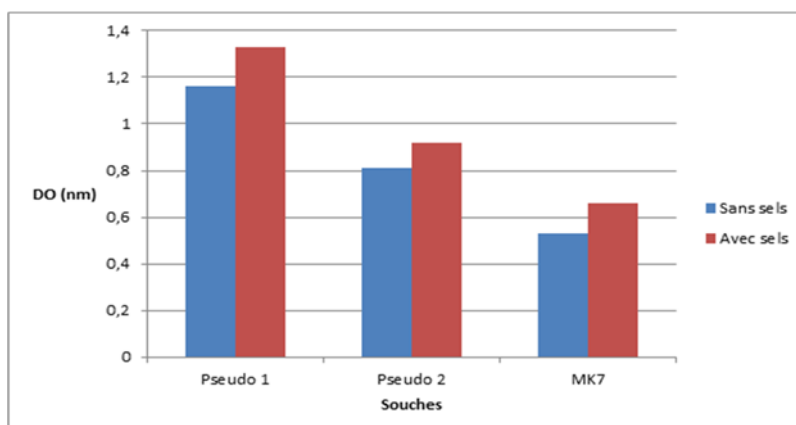


Figure 15: Résultats de l'effet des sels biliaires (0.3%oxgall) sur les souches testées, estimé par le suivi de la densité optique.

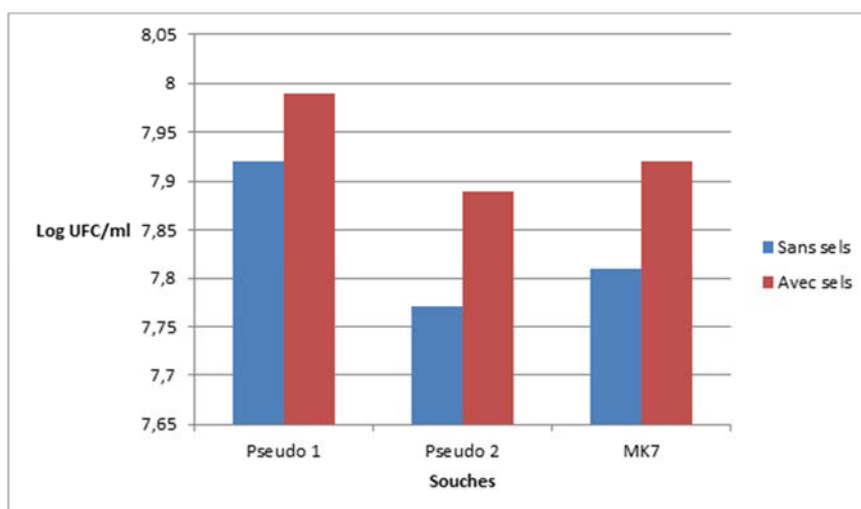


Figure 16: Résultats de l'effet des sels biliaires (0.3%oxgall) sur les souches testées, estimé par le suivi de la charge microbienne.

Les sels biliaires sont des substances potentiellement inhibitrices de la croissance de certaines bactéries présentes dans les environnements gastriques, les organismes probiotiques doivent donc impérativement résister à une concentration élevée de ces sels biliaires (GRACIELA et MARIA, 2001 ; FAO, 2001).

Nos 3 souches *Pseudomonas aeruginosa* MK7, Pseudo 1 et Pseudo 2 présentent une résistance aux sels biliaires, leur concentration reste donc importante après 3h d'incubation.

Les résultats de résistance aux sels biliaires et au pH gastrique obtenus confirment le fort potentiel d'adaptation du genre *Pseudomonas* (ROSSIGNOL, 2007) et confirment que nos souches peuvent potentiellement être utilisées comme probiotique.

Les souches sélectionnées répondent aux critères fonctionnels et aux critères de sécurité confirmant leur potentiel probiotique et permettant leur utilisation notamment en aquaculture. Bien que très peu d'applications *in vivo* du genre *Pseudomonas* en tant que probiotique ont été effectuées en raison de son caractère de pathogène opportuniste, une étude menée par MAHDHI et al., (2009) a prouvé que l'utilisation d'une espèce du genre *Pseudomonas* a considérablement amélioré la croissance et la production totale de biomasse des larves d'Artémias de culture. En effet, les tests d'antagonisme et d'adhésion démontrent que l'espèce utilisée est adhérente et joue un rôle important dans l'amélioration et la protection de la culture d'Artémia contre les agents pathogènes. Une autre étude menée par HOQUE et al., (2018) *in vivo* a montré que l'utilisation d'une souche *Pseudomonas aeruginosa* a augmenté le taux de survie des alevins Rohu contre l'agent pathogène *Aeromonas hydrophila* ce qui prouve l'efficacité de *Pseudomonas* dans l'amélioration de l'état de santé et la résistance aux maladies des poissons. Ces résultats suggèrent ainsi que les souches *Pseudomonas* isolées de *Sepia officinalis* sont eux aussi de potentiels candidats probiotiques pouvant être utilisés en aquaculture.

CONCLUSION

Ce travail a pour but de mettre en évidence le potentiel probiotique de souches bactériennes issues de la flore intestinale de l'espèce *Sepia officinalis* en vue d'une éventuelle utilisation dans le domaine de l'aquaculture notamment. Pour ce faire, diverses propriétés ont été recherchées dans ces souches, à savoir: la capacité de production de biofilm, le pouvoir antagoniste, l'antibio-résistance, la résistance au faible pH gastrique et aux sels biliaries ainsi que l'absence d'activité hémolytique.

A partir du tube digestif d'un échantillon commercialisé de *Sepia officinalis*, 13 différentes souches ont été isolées et la majorité des souches ont été identifiées comme étant des *Pseudomonas spp.* L'étude *in vitro* effectuée sur les 13 souches a révélé de bonnes performances au plan de pouvoir antimicrobien contre des agents pathogènes comme *E.coli* ECTC8, K12, *Aeromonas hydrophila* et *Vibrio fluvialis*, un pouvoir d'adhésion globalement important et une sensibilité variables vis-à-vis de différents antibiotiques. Les 3 souches sélectionnées ont démontré une activité antimicrobienne sur toutes les souches indicatrices, une forte production de biofilm particulièrement pour la souche Pseudo2 *Pseudomonas aeruginosa*, une résistance aux différents pH acides ainsi qu'aux sels biliaries. En ce qui concerne les tests de biosécurité, les résultats sont relativement rassurants car bien que les espèces du genre *Pseudomonas* soient connues pour leur résistance naturelle, les 3 souches sont toutefois sensibles aux antibiotiques: Aztréonam, amikacine, gentamicine et ciprofloxacine et aucune souche n'a présenté d'hémolyse totale.

Ce travail nous a permis de mettre en évidence le caractère probiotique de 3 souches qui ont répondu favorablement à tous les critères de sélection. Ces résultats permettent d'entrevoir des perspectives quant aux potentielles applications possibles en aquaculture ainsi que dans la recherche et l'identification des mécanismes et des substances inhibitrices responsables du caractère probiotique des souches qui les secrètent.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AIYAGARI RAMESH S.M. (2015). Bacteriocin-producing strains of *Lactobacillus plantarum* inhibit adhesion of *Staphylococcus aureus* to extracellular matrix: quantitative insight and implications in antibacterial therapy, *Journal of microbiology medicine*, [en ligne] [Consulté le 23.10.2020], Volume 64, Issue 12, Pages 64-82. Disponible sur le web : <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000181>>

ALEGRE I., ABADIAS M., ANGUERA M. [et al.] (2009). Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. *Food Microbiology* [En ligne] [consulté le 10.04.2020] Volume 27, Issue 1, Pages 70-76. Disponible sur le web <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002009001841>>

ALIWINSKI-KORELL A., HARALD E., KAMPKA M. [et al.] (1999). Oligomerization and structural changes of the pore-forming *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin, *European Journal of Biochemistry* [en ligne], [Consulté le 20.10.2020], Volume 256, Issue 1, Pages 221-230. Disponible sur le web : <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1432-1327.1999.00718.x>

ARINDAM M. et SUMAN M. (2016), Biofilm mediated decontamination of pollutants from the environment, *AIMS Bioengineering* [en ligne], [Consulté le 23.10.2020], Volume 3, Issue 1, Pages 44-59. Disponible sur le web : <<http://www.aimspress.com/article/10.3934/bioeng.2016.1.44>>

ARSENAULT-BREARD Jessica (2011). *Effet des probiotiques Lactobacillus helveticus RO052 et Bifidobacterium longum RO175 sur la dépression post-infarctus du myocarde chez le rat.* Mémoire de maîtrise ès Science en Pharmacologie. Option cardiovasculaire. Montréal : Université de Montréal. Disponible sur le web <<https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/5457?locale-attribute=fr>>

BALCAZAR J.L., DE BLAS I., RUIS ZARZUELA I. [et al.] (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. [En ligne] [consulté le 06.05.2020] Volume 114, Issues 3-4, Pages 173-186. Disponible sur le web <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113506000265>>

BAREFOOT S.F. et KLAENHAMMER T.R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, [En ligne] [consulté le 11/09/2020] Volume 45, Issue 6, page 22-25. Disponible sur le web : <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6410990/>>

BARLOW S., CHESSON A., COLLINS J.D [et al.] (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee. *EFSA Journal* [En ligne] [consulté le 12.04.2020] Volume 5, Issue 12, Pages 1-16. Disponible sur le web <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2007.587>>

BARRONS R. et TASSONE D. (2008). Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. *Clinical Therapeutics*. [En ligne] [consulté le 28.04.2020] Volume 30, Issue 3, Pages 453-468. Disponible sur le web <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0149291808001264>>

BARTHOLOMEW J.W. et MITTWER T. (1952). THE GRAM STAIN, *American Society For Microbiology*, [en ligne], [Consulté le 15.10.2020] Volume 16, Issue 2, Pages 20-22. Disponible sur le web : <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2011.05044.x>>

BERNARDEAU M. et VERNOUX J.P. (2009). *Utilisation des probiotiques en alimentation porcine et avicole* [En ligne] [consulté le 01.05.2020] FACW, 9^{ème} journée des productions porcines et avicoles. Disponible sur le web <<https://www.yumpu.com/s/G8xwFifjW2pLNnWZ>>

BOUCHARD, Damien (2013). *Potentiel probiotique des bactéries lactiques de l'écosystème mammaire bovin contre les mammites à Staphylococcus aureus.* Thèse de doctorat. Science et technologie du Lait et de l'œuf.

France : Université de Rennes1. Disponible sur le web
< <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01397499>>

CASTEX M., LEMAIRE P., WABETE N. [et al.] (2009). Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture* [En ligne] [consulté le 05.05.2020] Volume 294, Issue 3-4, Pages 306–313. Disponible sur le web
< <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848609005328>>

CASTILLO C.B. et BRUCKNER D.A. (1984) Comparative evaluation of the Eiken and API 20E systems and conventional methods for identification of members of the family Enterobacteriaceae, *American Society for Microbiology Journals* [en ligne] [consulté le 22.05.2020] Volume 32, Issue 3, Pages 20-23 Disponible sur le web : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC271425/>>

CHANDRAMOHAN S.D. et BHARATHI L.A. (1986). Differential sensitivity of pigmented and non-pigmented marine bacteria to metals and antibiotics, *Water Research* [en ligne] [Consulté le 15.09.2020], Volume 26, Issue 4, Pages 20-23. Disponible sur le web :
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0043135492900423>

COLLADO M. C. et SANZ Y. (2009). *Probiotics: Benefits in Human Health and Bacterial Disease Management*. Germany: WILEY-VCH Verlag GMBH & Co. KGaA. Chapitre 117. New Strategies Combating Bacterial Infection. Pages 275–295.

COSTERTON J.W., CHENG K.J, GESEY G.G. [et al.] (1987). Bacterial Biofilm in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology* [en ligne] [Consulté le 11.10.2020], Volume 41, Issue 10. Disponible sur le web : <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251?journalCode=micro>>

COSTERTON J.W., STEWART P.S. et GREENBER E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* [en ligne], [consulté le 18.09.2020], Volume 21, Issue 5, Pages 20-23. Disponible sur le web : <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10334980/>>

DHARMARAN K. et SRIDEVI (2010). Bioactive potential of *Streptomyces* against fish and shellfish pathogens. *Irian Journal of Microbiology* [En ligne] [consulté le 07.05.2020] Volume 2, Issue 3, Page 157-164. Disponible sur le web
<https://www.researchgate.net/publication/221844968_Bioactive_potential_of_Streptomyces_against_fish_and_shellfish_pathogens>

DUGAS B., MERCENIER A., LENOIR-WIJNKOOP I., ARNAUD C., DUGAS N. et POSTAIRE E. (1999). Immunity and probiotics. *Immunology today* [En ligne] [consulté le 30.03.2020], Volume 20, Issue 9, Pages 387-390. Disponible sur le web
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016756999014486>>

DUNNE C., O'MAHONY L., MURPHY I [et al.] (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition* [En ligne] [consulté le 08.04.2020] Volume 77, Issue 2, Pages 386-392. Disponible sur le web
< <https://academic.oup.com/ajcn/article/73/2/386s/4737567>>

EISSA A., BADR A.M. et MAHANA A. (2014) Assessment of Heavy Metal Levels in Water and Their Toxicity in Some Tissues of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in River Nile Basin at Greater Cairo, Egypt, *Global Veterinaria* [en ligne]. [Consulté le 12.10.2020], Volume 13, Issue 3, Pages 5-10. Disponible sur le web : <<https://cutt.ly/bhOUEHg>>

EL-JENI R., EL BOUR M., CALO6MATA P. [et al.] (2015) In vitro probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes. *Canadian Science Publishing* [en ligne], [Consulté le :22/06/2020], Volume 62, Issue 1, Pages 5-4. Disponible sur le web : <<https://cdnscepub.com/doi/abs/10.1139/cjm-2015-0481>>

FARHANA HOQUE T, JAWAHAR ABRAHAM, AND P. JAISANKAR, Isolation and partial characterisation of secondary metabolites from fish-borne bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Indian J.Fish* [en ligne], [Consulté le 16.11.2020], Volume 66, Issue 1, Pages 81-96. Disponible su le web : <<https://cutt.ly/lhOUFaN>>

- GUILLAUME LEMETAIS (2012).** *Sélection et intégration d'une souche probiotique fonctionnelle dans une matrice sèche* (thèse). Sciences agricoles. Université de Bourgogne, p159
- GISMONDO M.R., DRAGO L. et LOMBARDI A. (1999).** Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Antimicrob agents* [en ligne],[Consulté le 21.10.2020], Volume 12, Issue 4, Pages 25-29. Disponible sur le web : <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10493604/>>
- GOVINDAN D., VIERO C., SHIBUYA I. [et al.] (2010)** Oxytocin: Crossing the Bridge between Basic Science and Pharmacotherapy. *CNS Neuroscience and Therapeutics* [en ligne]. [Consulté le 23.06.2020], Volume 16, Issue 5, Pages 5-2. Disponible sur le web : <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1755-5949.2010.00185.x>>
- GUILLOT J.F (1998).** **Probiotics in animal nutrition.** *Agricultural science and technology information* [En ligne] [consulté le 31.03.2020], Volume 7, Issue 1, Pages 49-54. Disponible sur le web <<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR1998003144>>
- HACINI-RACHINEL F., GHEIT H. et LE LUDUEC J.B. [et al.] (2009).** Oral probiotic control skin inflammation by acting on both effector and regulatory T cells. *PLoS One* [En ligne] [consulté le 30.04.2020] Volume 4, Issue 3, Page e4903. Disponible sur le web <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654141/>>
- HAI N. V. (2015).** The use of probiotics in aquaculture. *Journal of applied microbiology* [En ligne] [consulté le 02.04.2020] Volume 119, Issue 4, Pages 917-935. Disponible sur le web <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.12886>>
- HOESL C.E. et ALTWEIN J.E. (2005).** The probiotic approach: an alternative treatment option in urology, *European Urology* [En ligne] [consulté le 30.04.2020] Volume 47, Issue 3, Pages 288-296. Disponible sur le web <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0302283804004993>>
- HONG H. A., DUC L.H. et CUTTING. S.M. (2005).** The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS microbiology reviews* [En ligne] [consulté le 22.04.2020] Volume 29, Issue 4, Pages 813-835. Disponible sur le web <<https://academic.oup.com/femsre/article/29/4/813/493366>>
- HUANG R., WANG K. et HU J. (2016).** Effect of Probiotics on Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients* [En ligne] [consulté le 02.05.2020] Volume 8, Page 483. Disponible sur le web <<https://www.mdpi.com/2072-6643/8/8/483>>
- ISLAM S.U. (2016).** Clinical Uses of Probiotics. *Medicine (Baltimore)* [En ligne] [consulté le 25.04.2020] Volume 95, Issue 5, Pages 3-4. Disponible sur le web <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4748908/>>
- IDOUI T., BENHAMADA N. et LEGHOUCHE E. (2009).** Microbial quality, physicochemical characteristics and fatty acid composition of a traditional butter produced from cows, *Journal of microbiology* [En ligne],[Consulté le 22.10.2020],Volume 5, Issue 2, Pages23-32. Disponible sur le web : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3279811/>>
- IGBINOSA I.H., BESHIRU A., ODJADJARE A. [et al.] (2017).** Pathogenic potentials of Aeromonas species isolated from aquaculture and abattoir environments. *Microbial Pathogenesis* [en ligne],[consulté le 22.11.2020], Volume 5, Issue 2, Pages 52-69. Disponible sur le web : <<https://cutt.ly/KhOlvfh>>
- JACKOBSEN C.N., NIELSEN V.R., HAYFORD A.E [et al.] (1999).** Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus spp.* by *in vitro* techniques and evaluation of colonization ability of five selected strains in humans. *Environmental and public health microbiology* [En ligne] [consulté le 08.04.2020] Volume 65, Issue 11, Pages 449-456. Disponible sur le web <<https://aem.asm.org/content/65/11/4949>>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- JIMENEZ G., BLANCH A. et CASTILLO M. [et al.] (2008).** Efficacité du probiotique *Bacillus cereus* var. toyoi en truies. *Journées Recherche Porcine* [En ligne] [consulté le 04.05.2020] Volume 40, Pages 225-226. Disponible sur le web
< <http://journees-recherche-porcine.com/texte/2008/alim/pal08.pdf>>
- KLAENHAMMER T.R. et KULLEN J .M. (1999).** Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* [En ligne] [consulté le 05.05.2020] Volume 50, Issues 1-2, Pages 45-57. Disponible sur le web
< <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160599000768>>
- KORKEA-AHO T.L., HEIKKINEN K.D., THOMPSON A. [et al.] (2011).** *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*, *Journal of applied Microbiology* [En ligne] [Consulté le :17.09.2020], Volume 111, Issue 2, Pages 25-32. Disponible sur le web
<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2011.05044.x>
- LAMARI F., SADOK K., BAKHROUF A. [et al.] (2014).** Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and *in vivo* test on *Artemia nauplii*. *Aquaculture international* [En ligne] [consulté le 06.05.2020] Volume 22, Pages 699-709. Disponible sur le web
< <https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-013-9699-5>>
- LAMBERT H. et CHEN M. (2006),** Antimicrobial resistance, inflammatory responses: A comparative analysis of pathogenicities, knowledge hybrids and the semantics of antibiotic use, *Nature communications* [en ligne] [Consulté le 21.11.2020], Volume 10, Issue 5, Pages 23-42. Disponible sur le web
<<https://www.nature.com/articles/s41599-019-0293-y>>
- LARPENT J.P., CHATEAU N., CASTELLANOS M.I [et al] (1994).** *Les probiotiques en alimentation animale et humaine*. France : Tec & Doc. Chapitre 2, Mode d'action des probiotiques, Pages 30-55.
- LAYRAL GUY et JOFFIN JEAN-NOËL (2005).** Microbiologie techniques, *dictionnaire des techniques*. 3ème édition. France : Scérén CRDP Aquitaine. Page 75.
- LUCAS N., AZHAR S., DEROISSART C. [et al.] 2019.** Un nouveau probiotique, *Hafnia alvei*, réduit le gain de poids dans deux modèles murins d'obésité en agissant sur les voies centrales et périphériques de l'homéostasie énergétique. *Nutrition clinique et métabolisme* [En ligne] [consulté le 03.05.2020] Volume 33, Issue 1, Pages 22-23. Disponible sur le web
< <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0985056219302572>>
- LUTZ H.L., RAMIREZ-PUEBLA S.T., ABBO L. [et al.] (2019)** A Simple Microbiome in the European Common Cuttlefish, *Sepia officinalis*. *American Society For Microbiology Journals* [En ligne] [consulté le 30.04.2020] Volume 35, Issue 6, Pages 40-43. Disponible sur le web :
<<https://msystems.asm.org/content/4/4/e00177-19.abstract>>
- MACK D.R., MICHAÏL S., WEI S. [et al.] (1999).** Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology* [En ligne] [consulté le 20.04.2020] Volume 276, Issue 1, Pages G941-G950. Disponible sur le web
<<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpgi.1999.276.4.G941>>
- MACOUZET M. (2015).** Nourriture probiotique pour chiens : Nouvelles perspectives scientifiques, technologiques et commerciales. *IDPF-IDAP* [En ligne] [consulté le 23.04.2020] ISSN 1929-4271, 14 Pages. Disponible sur le web
< http://evl.homestead.com/PI-Fr-4_01_2015.pdf>
- MADHI A., HMILA Z., BEHI A. [et al.] (2011),** Preliminary characterization of the probiotic properties of *Candida famata* and *Geobacillus thermoleovorans*, *Iranian Journal of microbiology* [En ligne] [Consulté le 23.11.2020], Volume 3, Issue1, Page 32. Disponible sur le web :
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3279811/>>

- MALDONADO N.C., DE RUIZ C.S., CECILIA M. [et al.] (2007).** A simple technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL1058 whole cells and products. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends. Applied Microbiology* [En ligne] [Consulté le 10/10/2020], Volume 70, Issue7, Pages 52–59. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X20304332>
- MARAGKOUKAKIS P.A., ZOUMPOPOULOU G.G., MIARIS G. [et al.] (2006).** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* [En ligne],[Consulté le 5/04/2020],Volume16, Issue 3,Pages 189-199. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694605000816>
- MARTEAU P., DORE J. et COSSART P. (2017).** *Le microbiote intestinal: un organe à part entière.* Montrouge : Éditions John Libbey eurotext. Chapitre 31, Les probiotiques, Pages 291-304
- MARTINEZ CRUZ P., IBANEZ A.L., MONROY HERMOSILLO O.A. [et al.] (2012).** Use of probiotics in aquaculture. *International Scholarly Research Notices* [En ligne] [consulté le 06.05.2020] Volume 2012, 13 Pages. Disponible sur le web <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/916845/>
- MELIANI A. et BENSOLTANE A. (2015).** Review of *Pseudomonas* Attachment and Biofilm Formation in Food Industry. *Poultry, Fisheries & Wildlife*[en ligne], [Consulté le 23.10.2020], Volume 3, Issue 1, Pages 55-60. Disponible sur le web : https://www.researchgate.net/publication/292678337_Review_of_Pseudomonas_Attachment_and_Biofilm_Formation_in_Food_Industry
- MOUSTARDIER Georges (1972).** *Bactériologie médicale*, 4^{ème} édition, France : Maloine 1959. Page 213.
- MURRAY P.R., BARO E.J., PFALLER M.A. [et al.] (1999)** *Manual of clinical microbiology.* 7^{ème} édition. America: American Society for Microbiology ASM 2003. , Pages 13-47.
- MUTHUKUMAR P. et KANDEEPAN C. (2015).** Isolation, Identification and Characterization of Probiotic Organisms From Intestine of Fresh Water Fishes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [en ligne], [.Consulté le 10/07/2020], Volume 4, Issue 3, Pages 2-3. Disponible sur le web : https://scholar.google.com/scholar?hl=fr&as_sdt=0%2C5&as_vis=1&q=MUTHUKUMAR+et+KANDEEPAN%2C+2015&btnG
- NÄSE L., HATAKKA K. et SAVILAHTI E. [et al.] (2001).** Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children, *Caries Research* [En ligne] [consulté le 30.04.2020] Volume 35, Issue 6, Pages 412-420. Disponible sur le web <https://www.karger.com/Article/Abstract/47484>
- NAYAK S.K. (2010).** Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology* [En ligne] [consulté le 06.05.2020] Volume 29, Issue 1, Pages 2-14. Disponible sur le web < <http://europepmc.org/article/med/20219683>>
- NG S.C., HART A.L., KAMM M.A. [et al.] (2009).** Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases* [En ligne] [consulté le 22.04.2020] Volume 15, Issue 2, Pages 300-310. Disponible sur le web <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/15/2/300/4643557>
- NICOLAS J.S., GATESOUBE F.J., FROUEL S. [et al.] (2007).** Quelles stratégies alternatives aux antibiotiques en aquaculture ? *La revue INRAE Productions Animales.* [En ligne] [consulté le 04.05.2020] Volume 20, Issue 3, Pages 253-258. Disponible sur le web <https://productions-animales.org/article/view/3465>
- NIKAIDO H. (2009).** Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of Biochemistry* [En ligne] [consulté le 05.05.2020] Volume 78, Pages 119-146. Disponible sur le web <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>

- O'TOOLE P.W et COONEY J.C. (2008).** Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* [En ligne] [consulté le 10.04.2020] Volume 2008, Pages 9. Disponible sur le web < <https://www.hindawi.com/journals/ipid/2008/175285/>>
- OUWEHAND A.C., KIRJAVAINEN P.V., SHORTT C. [et al.] (1999).** Probiotics: mechanisms and established effects. *International diary journal* [En ligne] [consulté le 09.04.2020] Volume 9, Issue 1, Pages 43-52. Disponible sur le web < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694699000436>>
- OUWEHAND A.C., SALMINEN S. et ISOLAURI E. (2002).** Effect of Probiotics on Constipation, Fecal Azoreductase Activity and Fecal Mucin Content in the Elderly. *Annals of nutrition and metabolism* [En ligne] [consulté le 04.05.2020] Volume 46, Issues 3-4, Pages 159-162. Disponible sur le web < <https://www.karger.com/article/Abstract/63075>> !
- OZEN M. et DINLEYICI E. C. (2015).** The history of probiotics: the untold story. *Beneficial microbes* [En ligne] [consulté le 30.03.2020] Volume 6, Issue 2, Pages 159-165. Disponible sur le web < <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR1998003144>>
- QUIEROZ J.F. et BOYD C.E. (1998).** Effects of a Bacterial Inoculum in Channel Catfish Ponds. *World Aquaculture Society* [En ligne] [consulté le 06.05.2020] Volume 1, Issue 1, Page 67-73. Disponible sur le web < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-7345.1998.tb00300.x>>
- REID A., BRYANT J. et SHORT F. (2020).** *Bacterial genomes: Disease outbreaks and antimicrobial resistance*. Wellcome Genome Campus Advance Courses and Scientific Conferences [En ligne] [consulté le 30.03.2020]. Disponible sur le web < <https://www.futurelearn.com/courses/introduction-to-bacterial-genomics>>
- RINGO E., VAN DOAN H., LEE S. [et al.] (2019).** Lactic acid bacteria in shellfish: possibilities and challenges. *Reviews in fisheries science and aquaculture* [En ligne] [consulté le 05.04.2020] Volume 28, Issue 2, Pages 139-169. Disponible sur le web < <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/23308249.2019.1683151>>
- ROOS T.B., MORAES C.M. et STURBELLE R.T. [et al.] (2018).** Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Research in Veterinary Science* [En ligne] [consulté le 03.05.2020] Volume 117, Pages 260-265. Disponible sur le web < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29331687/>>
- ROSSI A., ROSSI T. et BERTINI M. [et al.] (2010).** The use of *Lactobacillus rhamnosus* in the therapy of bacterial vaginosis Evaluation of clinical efficacy in a population of 40 women treated for 24 months. *Archives of Gynecology and Obstetrics* [En ligne] [consulté le 01.05.2020] Volume 281, Pages 1065-1069. Disponible sur le web < <https://link.springer.com/article/10.1007/s00404-009-1287-6>>
- ROSSIGNOL, Gaell (2007),** *Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche hospitalière de Pseudomonas fluorescens :activité hémolytique et variation phénotypique.* Thèse de doctorat. France. Université de Rouen. Disponible sur le web : https://tel.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/369543/filename/These_G._Rossignol.pdf
- ROY D. (2006).** Innocuité, qualité et efficacité des probiotiques. Résumé du rapport « Développement d'une expertise de pointe et de méthodes efficaces et rigoureuses en matière d'innocuité, qualité et efficacité des probiotiques. AISA. Disponible sur le web < http://www.aisa-ahif.org/index.php?menu=dossier_reglementaire>
- RUAS-MADIEDO P., GUEIMONDE M., MARGOLLES A. [et al.] (2006).** Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *Journal of food protection* [En ligne] [consulté le 05.05.2020] Volume 69, Issue 8, Pages 2011-2015. Disponible sur le web < <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/69/8/2011/172589/Exopolysaccharides-Produced-by-Probiotic-Strains>>

- SAARELA M., MOGENSEN G., FONDEN R. [et al.] (2000).** Probiotic bacteria : safety, functional an technological properties. *Journal of Biotechnology* [En ligne] [consulté le 04.05.2020] Volume 84, Issue 3, Pages 197-215. Disponible sur le web < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016816560003758>>
- SANDERS M.E., AKKERMANS L.M., HALLER D. [et al.] (2010).** Safety assessment of probiotics in human use. *Gut microbes* [En ligne] [consulté le 15.04.2020] Volume 13, Issue 1, Pages 85-99. Disponible sur le web < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21327023/>>
- SANTOSA S., FARNWORTH E. et PETER J.H. Jones, 2006.** Probiotics and their potential health claims. *Nutrition Reviews*. [En ligne] [consulté le 26.04.2020] Volume 64, Issue 6, Pages 265-274. Disponbile sur le web < <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article/64/6/265/1830811>>
- SAPKOTA, A., KUCHARSKI A.R. , BURKE M. [et al.] (2008).** Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environment International* [En ligne] [consulté le 05.05.2020] Volume 34, Issue 8, Pages 1215–1226. Disponible sur le web < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412008000718>>
- SAUTER S.N, BENYACOUB J, ALLENSPACH K, [et al.] (2006).** Effects of probiotic bacteria in dogs with food responsive diarrhea treated with an elimination diet. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. [En ligne] [consulté le 26.04.2020] Volume 90, Issue 7-8, Pages 269-277. Disponible sur le web < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0396.2005.00595.x>>
- SHAABAN S.Y., EL GENDY Y.G. et MEHANNA S.N. [et al.] 2017.** The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: A prospective, open-label study. *Nutritional neuroscience* [En ligne] [consulté le 03.05.2020] Volume 21, Issue 9, Pages 676-681. Disponible sur le web < <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1028415X.2017.1347746>>.
- SHANAHAN F. (2012).** A commentary on the safety of probiotics. *Gastroenterology Clinics* [En ligne] [consulté le 03.05.2020] Volume 41, Issue 4, Pages 869-876. Disponible sur le web < [https://www.gastro.theclinics.com/article/S0889-8553\(12\)00100-8/fulltext](https://www.gastro.theclinics.com/article/S0889-8553(12)00100-8/fulltext)>
- SHERMAN P.M., OSSA J.C. et JOHNSON-HENRY K. (2009).** Unraveling Mechanisms of Action of Probiotics. *Nutrition in Clinical Practice* [En ligne] [consulté le 15.04.2020] Volume 24, Issue 1, Pages 10-14. Disponible sur le web < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1177/0884533608329231>>
- SHISHEHCHIAN F., YUSOFF F. M. et SHARIFF M. (2001).** The effects of commercial bacterial products on macrobenthos community in shrimp culture ponds. *Aquaculture International* [En ligne] [consulté le 06.05.2020] Volume 9, Issue 5, Pages 429–436. Disponible sur le web < <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020582417487>>
- SHOKRYAZDAN P., FASELEH JAHROMI M. et LIANG J.B. [et al.] (2017).** Probiotics: From Isolation to Application. *Journal of the American college of Nutrition* [En ligne] [consulté le 01.05.2020] Volume 35, Pages 666-676. Disponible sur le le web < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28937854/>>
- SIMON Mélanie (2019).** *L'anxiété chez le chien, les répercussions sur le microbiote intestinal : intérêt de l'utilisation des probiotiques dans la prise en charge thérapeutique.* Thèse de doctorat d'état. Médecine Vétérinaire. Toulouse : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Disponible sur le web < https://oatao.univ-toulouse.fr/25833/1/Simon_25833.pdf>
- SIMON O., JADAMUS A. et VAHJEN W. (2001).** Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. *Archiv für Tierernaehrung* [En ligne] [consulté le 30.04.2020] Volume 54, Issue 1, Pages 1-17. Disponible sur le web < <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17450390109381962>>
- TABBERS M.M., DE MILLIANO I., ROSEBOOM M.G. [et al.] (2011).** Is *Bifidobacterium breve* effective in the treatment of childhood constipation? Results from a pilot study. *Nutrition Journal* [En ligne] [consulté le

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

25.04.2020] Volume 10, Pages 10-19. Disponible sur le web

< <https://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2891-10-19>>

TRAN NGOC T., MINH P.D. et KISHIO H., (2013). Overview of the use of probiotics in aquaculture. *International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture* [En ligne] [consulté le 05.0.2020] Volume 3, Pages 89-97. Disponible sur le web

<https://www.researchgate.net/publication/274255141_Overview_of_the_use_of_probiotics_in_aquaculture#>

VANDENPLAS Y., HUYS G. et DAUBE G. (2015). Probióticos: informações atualizadas, *Jornal de Pediatria*, [En ligne] [consulté le 20.04.2020] Volume 91, Issue 1, Pages 6-21. Disponible sur le web <

https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0021-75572015000100006&script=sci_abstract&tlng=pt>

VANKERCKHOVEN J., MOSTAFA N., HERMANS K. [et al.] (2008). Antimicrobial Resistance of Old and Recent *Staphylococcus aureus* Isolates from Poultry: First Detection of Livestock-Associated Methicillin-Resistant Strain ST398, *American society for microbiology* [En ligne] [consulté le 25.10.2020], Volume 10, Issue 5, Pages 51-69. Disponible sur le web <<https://aac.asm.org/content/52/10/3817.short>>

VEERENDRAKUMAR M. et JANAKIRAM P. (2015). Antagonistic Activity Exhibited by Crude Extracts of *Pseudomonas aeruginosa* (PIC-4) against *Aeromonas hydrophila* and *E. coli*, *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research* [En ligne] [consulté le 22.09.2020], Volume 4, Issue 1, Pages 5-10. Disponible sur le web

<<http://www.ijlbpr.com/uploadfile/2015/0422/20150422054535342.pdf>>

WU X., VALLANCE B.A., BOYER L. et al. (2008). *Saccharomyces boulardii* ameliorates *Citrobacter rodentium*-induced colitis through actions on bacterial virulence factors. *American Journal of Physiology* [En ligne] [consulté le 15.04.2020] Volume 294, Issue 1, Pages G296-G306. Disponible sur le web

< <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpgi.00173.2007>>

YANG Y.J. et SHEU B.S. (2012). Probiotics-containing yogurts suppress *Helicobacter pylori* load and modify immune response and intestinal microbiota in the *Helicobacter pylori*-infected children, *Helicobacter*. [En ligne] [consulté le 01.05.2020] Volume 17, Issue 4, Pages 297-304. Disponible sur le web <

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22759330/>>

ملخص

الهدف من هذا العمل هو إظهار إمكانات البروبيوتيك لـ 13 سلالة بكتيرية مختلفة سلبية الجرام معزولة من الجهاز الهضمي

للرخويات *Sepia officinalis* للتطبيقات الممكنة في الاستزراع المائي. تم تحديد واختبار السلالات الـ 13 لأول مرة من أجل: نشاطها المضاد للميكروبات ضد 5 سلالات مؤشرة ممرضة (*Pseudomonas aeruginosa* و *E.coli* ECTC8 و *E.coli* k12 و *Aeromonas hydrophila* و *Vibrio fluvialis*) ، مقاومة المضادات الحيوية وإنتاجها من الأغشية الحيوية. أدت النتائج التي تم الحصول عليها إلى اختيار 3 سلالات *Pseudomonas aeruginosa* التي تعتبر ذات أهمية (Pseudo1 و Pseudo2 و MK7). أظهرت السلالات الثلاث نشاطًا كبيرًا مضادًا للميكروبات ضد سلالات المؤشرات الأربعة (باستثناء *Pseudomonas aeruginosa*). تعتبر سلالات Pseudo1 و MK7 منتجين متوسطين للبيوفيلم وسلالة Pseudo2 هي منتج قوي للغشاء الحيوي. أظهرت السلالات الثلاثة مقاومة طبيعية للمضادات الحيوية المختلفة وحساسية تجاه *Aztreonam* و *Amikacin* و *Gentamicin* و *Ciprofloxacin* بالإضافة إلى *Cefoxitin* لسلالة Pseudo2. في الخطوة الثانية ، تم اختبار السلالات الثلاثة المختارة لمقاومتها لدرجة الحموضة المعوية والأملاح الصفراوية بالإضافة إلى نشاطها الانحلالي. جميع السلالات الثلاثة مقاومة لدرجة الحموضة الحمضية والأملاح الصفراوية. أظهرت سلالات Pseudo2 و MK7 انحلال دم جزئي (انحلال دم) ولم تظهر سوى سلالة Pseudo1 نشاط انحلالي. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن السلالات الثلاثة تلبى المعايير الوظيفية ومعايير السلامة. إنها تمثل بروبيوتيك مرشحين واعدن في مجال تربية الأحياء المائية ، خاصة وأن النوع *Pseudomonas aeruginosa* قد أثبت فعاليته كبروبيوتيك في معالجة المياه وفي تحسين صحة الأنواع. تربية الأحياء المائية.

Résumé

L'objectif du présent travail consiste à mettre en évidence le potentiel probiotique de bactériennes à Gram négatif isolées à partir du tube digestif du mollusque *Sepia officinalis* en vue d'éventuelles applications en aquaculture. Les 13 souches ont été identifiées et testées dans un premier temps pour : leur activité antimicrobienne vis-à-vis de 5 (*Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli* ETC8 multirésistnte, *E.coli* k12, *Aeromonas hydrophila* et *Vibrio fluvialis*), leur production de biofilm et leur antibio-résistnce. Les résultats obtenus ont abouti à la sélection de 3 souches *Pseudomonas aeruginosa* jugées intéressantes (Pseudo1, Pseudo2 et MK7). Les 3 souches ont présenté une activité antimicrobienne importante vis-à-vis de 4 souches indicatrices (hormis *Pseudomonas aeruginosa*). Les souches Pseudo1 et MK7 sont de moyennes productrices de biofilm et la souche Pseudo2 est une forte productrice de biofilm. Les 3 souches ont présenté un profil de résistance naturelle à Dans un second temps, les 3 souches sélectionnées ont été testés pour leur résistance au pH gastrique et aux sels biliaires ainsi que pour leur activité hémolytique. Les 3 souches sont résistantes au pH acides et aux sels biliaires. Les souches Pseudo2 et MK7 ont présenté une hémolyse partielle (a-hémolyse) et seule la souche Pseudo1 n'a pas présenté d'activité hémolytique. Les résultats obtenus montrent que les 3 souches répondent aux critères fonctionnels et aux critères de sécurité. Elles représentent des candidats probiotiques prometteurs dans le domaine de l'aquaculture d'autant plus que l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* a démontré son efficacité en tant que probiotique dans le traitement des eaux et dans l'amélioration de l'état de santé d'espèces aquatiques d'élevage.

Mots clés : probiotiques, *Sepia officinalis*, activité antimicrobienne, *Pseudomonas aeruginosa*, production de biofilm, aquaculture

Summary

The objective of this work is to demonstrate the probiotic potential of 13 different Gram-negative bacterial strains isolated from the digestive tract of the mollusk *Sepia officinalis* for possible applications in aquaculture. The 13 strains were first identified and tested for: their antimicrobial activity against 5 pathogenic indicator strains (*Pseudomonas aeruginosa*, *multiresistant E.coli* ECTC8, *E.coli* k12, *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio fluvialis*), their antibiotic resistance and their biofilm production. The results obtained led to the selection of 3 strains of *Pseudomonas aeruginosa* considered to be of interest (Pseudo1, Pseudo2 and MK7). The 3 strains exhibited significant antimicrobial activity against 4 indicator strains (except for *Pseudomonas aeruginosa*). The Pseudo1 and MK7 strains are average producers of biofilm and the Pseudo2 strain is a strong producer of biofilm. The 3 strains exhibited a profile of natural resistance to different antibiotics and sensitivity to Aztreonam, Amikacin, Gentamicin and Ciprofloxacin in addition to Cefoxitin for the Pseudo2 strain. Secondly, the 3 strains were tested for their resistance to gastric pH and bile salts as well as for their hemolytic activity. All 3 strains are resistant to acidic pH and bile salts. The pseudo2 and MK7 strains exhibited partial hemolysis (α-hemolysis) and only the Pseudo1 strain didn't exhibit a hemolytic activity. The results obtained show that the 3 strains meet the functional and the safety criteria. They represent promising probiotic candidates in the field of aquaculture especially that *Pseudomonas aeruginosa* has already proven its effectiveness as a probiotic in the treatment of water and in the improvement of the health status of aquatic species of breeding.

Key words: probiotics, *Sepia officinalis*, antimicrobial activity, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm production, aquaculture.